

**Universidad Nacional de Costa Rica
Facultad de Ciencias de la Salud
Escuela de Medicina Veterinaria**

**Hallazgos anatomopatológicos en virtopsia, necropsia,
bacteriología e histopatología del sistema nervioso central
de cetáceos encallados en las playas de Costa Rica
durante el periodo 2017-2021.**

Modalidad: Práctica Dirigida

**Trabajo Final de Graduación para optar por el Grado
Académico de Licenciatura en Medicina Veterinaria**

Efraín Andrés Granados Zapata

**Campus Pbro. Benjamín Núñez
2021**

TRIBUNAL EXAMINADOR

Laura Bouza Mora, M.Sc.

Vicedecana Facultad Ciencias de la Salud

Julia Rodríguez Barahona, Ph.D.

Subdirectora Escuela Medicina Veterinaria

Gabriela Hernández Mora, Ph.D.

Tutora

Rocío González Barrientos, DVM.

Cotutora

Elías Barquero Calvo, Ph.D.

Lector

Fecha: _____

DEDICATORIA

A toda mi familia, soy enormemente bendecido por haber crecido y aprendido tantas cosas durante todos estos años junto a ellos.

A mi padre Efraín Granados Rivera por el gran apoyo que siempre me dio para tener la casa llena de animales desde que tengo memoria y por enseñarme mientras crecía la responsabilidad que conlleva cuidarlos y mantenerlos, nunca olvidaré aquella primera pecera de medio galón que me compró cuando con la ilusión de un niño, yo quería esos peces de colores que vi en la feria del agricultor, y que con el tiempo me dio paso a llenar la casa de todo tipo de peces, reptiles, anfibios, aves y mamíferos. A mi madre Martha Zapata Álvarez por el gran amor que siempre nos dio y que de manera muy natural hizo que parte de ese amor sea reflejado hacia la vida animal desde lo más profundo de mi corazón, también por permitirme tener tantos bichos en la casa y aunque ocuparan la sala, cocina, patio o habitación siempre me apoyó para verme feliz, por esa paciencia y cariño para explicar y enseñarnos las bases que nos servirán para toda la vida.

A mis hermanos Karen y Daniel, quienes me han aconsejado, inspirado y motivado a dar siempre lo mejor, aunque las condiciones no parecieran permitirlo, gracias por permanecer siempre unidos y dispuestos a escuchar o dar un valioso consejo, que me empujaba a seguir adelante ante cualquier nuevo reto y también por ser maravillosas personas con quienes puedo contar todos los días, siempre hacen que cualquier conversación juntos sea una experiencia única y brillante.

A mi abuela Lucila Álvarez González quién siempre me ha chineado, gracias por aquel primer reptil que me regaló y marcó mi niñez con total alegría, porque ahora me sigue obsequiando con todo su talento artesanías de animales con ese hermoso don y talento de sus manos, además por nutrirnos con su cariño y ese delicioso pancito que siempre nos ha preparado con todo el amor que solo una abuela puede dar.

Los amo a todos.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por permitirme vivir y acercarme a la carrera de mis sueños, gracias SEÑOR por guiarme en el camino para llegar hasta acá.

A la Dra. Gabriela Hernández Mora por depositar toda la confianza en mí para tener acceso completo a los casos incluidos en este trabajo, por acompañarme en este proceso y enseñarme tantas cosas del trabajo en laboratorio y en el campo, y que además de hacerme crecer profesionalmente, me dio muchos consejos que aportan mucho valor en mi aprendizaje personal.

A la Dra. Rocío González Barrientos por aceptar incluirla en este trabajo antes de que nos conociéramos, por tener mucha paciencia y dedicación para transmitirme y compartirme tanto conocimiento con el que fui entendiendo a profundidad procedimientos, mecanismos y fisiopatología de los hallazgos encontrados.

Al Dr. Elías Barquero Calvo, quien desde la formulación del trabajo aportó con entusiasmo ideas y sus consejos sirvieron para dar la mejor guía en el desarrollo de la práctica, gracias por abrir las puertas del laboratorio de bacteriología para hacer que los resultados fueran más completos.

A todos los que desde el Laboratorio de bacteriología y patología del SENASA aportaron su ayuda y conocimiento, gracias Jacky, Eunice, Osvaldo, Juan, Adrián, Amai, Josi, Juan Carlos, Carolina y German. A todos los compañeros de generación que se acercaron a dar su valiosa ayuda, gracias Karol, Wilson y Melissa. También a Gianmarco, Pala y Nacho.

Gracias especiales a Guille, Vale y Mónica por su ayuda durante toda la carrera y también en este trabajo. A Raque que siempre fue fundamental en los estudios que permitieron aprobar los cursos más rudos. Y por último a todos los compañeros, conocidos, profes, funcionarios y conserjes de la escuela quienes formaron parte de este camino lleno de aprendizajes.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

TRIBUNAL EXAMINADOR	i
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
ÍNDICE DE CONTENIDOS	iv
ÍNDICE DE CUADROS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xii
RESUMEN	xiii
ABSTRACT	xv
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Antecedentes.....	1
1.2. Justificación	5
1.2.1. Importancia.....	6
1.3. Objetivos	7
1.3.1. Objetivo General	7
1.3.2. Objetivos Específicos.....	7
2. METODOLOGÍA	8
2.1. Área de estudio	8
2.2. Tipo de estudio	8
2.3. Población estudiada	8
2.4. Envío y almacenamiento de animales	12

2.5. Virtopsia	12
2.5.1. Hallazgos del sistema nervioso central	12
2.5.1.1. Índice de Evans	13
2.5.1.2. Ángulo Calloso.....	13
2.5.2. Hallazgos del sistema osteoarticular	14
2.6. Necropsia y recolección de muestras	14
2.7. Bacteriología.....	15
2.7.1. Cultivos bacteriológicos	16
2.7.2. Caracterización molecular	18
2.8. Histopatología.....	18
2.8.1. Procesamiento de tejidos.....	19
2.8.2. Escaneo y graduación de lesiones	20
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	21
3.1. Estudios de tomografía	21
3.1.1. Hallazgos del SNC.....	21
3.1.1.1. Casos sin alteraciones.....	21
3.1.1.2. Casos con ventriculomegalia leve.....	25
3.1.1.3. Casos con ventriculomegalia moderada	28
3.1.1.4. Casos con ventriculomegalia severa.....	31
3.1.3. Ángulo Calloso	38
3.1.4. Hallazgos del sistema osteoarticular.....	41
3.2. Necropsias	44
3.2.1. Hallazgos del sistema nervioso central	45

3.2.2. Hallazgos del sistema osteoarticular	47
3.3. Bacteriología del SNC	48
3.4. Histopatología del sistema nervioso central	52
3.4.1. Grado 1	53
3.4.2. Grado 2	55
3.4.3. Grado 3	57
3.4.4. Grado 0	66
4. CONCLUSIONES	78
5. RECOMENDACIONES PARA EL SENASA	80
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. <i>Identificación de los casos encallados durante el periodo 2017-2021.</i>	9
Cuadro 2. <i>Identificación de las diferentes especies incluidas en la práctica dirigida.</i>	10
Cuadro 3. <i>Índice de Evans calculado en los siete animales que presentaron ventriculomegalia en diferentes grados de severidad.</i>	35
Cuadro 4. <i>Ángulos callosos estimados en los siete animales que presentaron ventriculomegalia en las regiones anatómicas peribullar y mandibular.</i>	38
Cuadro 5. <i>Cultivos y caracterización bacteriológica de cetáceos para Brucella spp. del SNC 2017-marzo 2021.</i>	50
Cuadro 6. <i>Hallazgos y lesiones asociadas en virtopsia, necropsia, bacteriología, histopatología y serología de los casos estudiados durante el periodo 2017-marzo 2021.</i>	75

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Ubicación de cetáceos encallados en Costa Rica durante el periodo 2017-2021, según la especie.</i>	11
Figura 2. <i>Vista dorsal del sistema nervioso central extraído en necropsia de AKA Francisco.</i>	15
Figura 3. <i>Corte transversal macro de la corteza frontal del SNC de Hernán.</i>	19
Figura 4. <i>Reconstrucción de imágenes transversales por TACPM del SNC en un corte transversal.</i>	22
Figura 5. <i>Reconstrucción de imágenes dorsales por TACPM del SNC en un corte dorsal.</i>	23
Figura 6. <i>Reconstrucción de imágenes sagitales por TACPM del SNC en un corte sagital.</i>	24
Figura 7. <i>Reconstrucción de imágenes transversales por TACPM del SNC en un corte transversal.</i>	25
Figura 8. <i>Reconstrucción de imágenes dorsales por TACPM del SNC en un corte dorsal.</i>	26
Figura 9. <i>Reconstrucción de imágenes sagitales por TACPM del SNC en un corte sagital.</i>	27
Figura 10. <i>Reconstrucción de imágenes transversales por TACPM del SNC en un corte transversal.</i>	29
Figura 11. <i>Reconstrucción de imágenes dorsales por TACPM del SNC en un corte dorsal.</i>	30

Figura 12. <i>Reconstrucción de imágenes sagitales por TACPM del SNC en un corte sagital.</i>	30
Figura 13. <i>Reconstrucción de imágenes transversales de TACPM del SNC en un corte transversal.</i>	32
Figura 14. <i>Reconstrucción de imágenes dorsales por TACPM del SNC en un corte dorsal.</i>	33
Figura 15. <i>Reconstrucción de imágenes sagitales por TACPM del SNC en un corte sagital.</i>	34
Figura 16. <i>Reconstrucción de imágenes dorsales por TACPM del SNC para calcular el índice de Evans.</i>	36
Figura 17. <i>Reconstrucción de imágenes dorsales por TACPM del SNC para calcular el índice de Evans.</i>	36
Figura 18. <i>Reconstrucción de imágenes transversales por TACPM del SNC en la región peribullar.</i>	39
Figura 19. <i>Reconstrucción de imágenes transversales por TACPM del SNC en la región mandibular.</i>	39
Figura 20. <i>Reconstrucción de imágenes del caso de Julián por TACPM en función 3D MPR en la región vertebral caudal.</i>	41
Figura 21. <i>Reconstrucción de imágenes del caso de Julián por TACPM en función 3D VR en la región vertebral caudal.</i>	42
Figura 22. <i>Reconstrucción de imágenes del caso de Francisco en función 3D MPR del cóndilo occipital.</i>	43

Figura 23. <i>Reconstrucción de imágenes de Francisco por TACPM en función 3D VR en la región occipital del cráneo de la vista caudal.</i>	43
Figura 24. <i>Vista medial del cerebro, corte sagital con ventriculomegalia.</i>	45
Figura 25. <i>Vista posterior del cerebro, corte oblicuo con ventriculomegalia.</i>	46
Figura 26. <i>Vista caudal del cóndilo occipital izquierdo con osteomielitis y osteólisis (flecha) del caso de Francisco.</i>	48
Figura 27. <i>Cultivo bacteriológico con UFC (flecha) de Brucella spp. en agar sangre luego de 6 días de crecimiento.</i>	49
Figura 28. <i>Corte histológico de cerebro y meninges de María José.</i>	53
Figura 29. <i>Corte histológico de cerebro y meninges de María José.</i>	54
Figura 30. <i>Corte histológico de cerebro y meninges de Chiibal Kiin.</i>	55
Figura 31. <i>Corte histológico de cerebro y meninges de Chiibal Kiin.</i>	56
Figura 32. <i>Corte histológico de cerebro de Chiibal Kiin.</i>	57
Figura 33. <i>Corte histológico de corteza occipital de Chiibal Kiin.</i>	58
Figura 34. <i>Perfiles totales de las lesiones con diferentes grados de severidad.</i>	59
Figura 35. <i>Perfiles parciales de las lesiones con diferentes grados de severidad.</i>	60
Figura 36. <i>Perfiles parciales de las lesiones con diferentes grados de severidad.</i>	61
Figura 37. <i>Diagrama con severidad de lesiones histopatológicas en vista medial del cerebro, corte sagital.</i>	62
Figura 38. <i>Diagrama con severidad de lesiones histopatológicas en vista dorsal del cerebro, corte horizontal.</i>	63
Figura 39. <i>Corte histológico de cerebro y meninges sin infiltrado inflamatorio de Vico</i>	66

Figura 40. <i>Perfiles totales y parciales de las lesiones con grado de severidad 0.....</i>	<i>67</i>
Figura 41. <i>Corte histológico transversal de médula espinal con poliradiculoneuritis de Chiibal Kiin.....</i>	<i>69</i>
Figura 42. <i>Corte histológico del plexo coroideo del IV ventrículo de la médula oblongada con coroiditis de Fernanda.</i>	<i>70</i>
Figura 43. <i>Corte histológico de la pared del ventrículo lateral de Eduardito.</i>	<i>71</i>
Figura 44. <i>Corte histológico de corteza frontal de Hernán con inclusión de un cuerpo de Lafora en neuroparénquima (flecha).</i>	<i>73</i>

LISTA DE ABREVIATURAS

AKA: Conocido como

CITES: Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres

EMV: Escuela de Medicina Veterinaria

H&E: Hematoxilina y eosina

IE: Índice de Evans

LCR: Líquido cefalorraquídeo

MLST: Tipificación de secuencia multilocus

MLVA: Análisis de número variable de loci múltiples de repeticiones en tándem

PIET: Programa de Investigación en Enfermedades Tropicales

PTO: Pacífico tropical oriental SENASA: Servicio Nacional de Salud Animal

ROI: Región de interés

SNC: Sistema nervioso central

SOA: Sistema osteoarticular

ST: Tipo de secuencia

TACPM: Tomografía axial computarizada post mortem

UFC: Unidades formadoras de colonias

UICN: Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza

WGS: Secuenciación del genoma completo

3D MPR: Reconstrucción multiplanar 3D

3D VR: Renderización de volumen 3D

RESUMEN

La fauna de cetáceos en Costa Rica incluye una estimación de 30 especies, esta biodiversidad representa el 33% de las especies de cetáceos del mundo y, por lo tanto, anualmente se reportan encallamientos de cetáceos a lo largo de las costas del Océano Pacífico y del mar Caribe. Los individuos encallados son una fuente de información valiosa para aumentar los conocimientos básicos y determinar el estado de salud de las poblaciones de cetáceos, evaluar la presencia de agentes infecciosos zoonóticos y determinar las causas de muerte y enfermedad de estos animales. El objetivo fue describir los hallazgos anatomopatológicos en virtopsia (necropsia virtual), necropsia e histopatología, y realizar pruebas bacteriológicas en el sistema nervioso central de cetáceos encallados en Costa Rica durante el periodo 2017-2021. En este período, el número de cetáceos encallados fue en promedio de cuatro a seis animales por año.

Se evaluaron 21 cetáceos de siete especies diferentes, entre los que se incluyen 14 *Stenella coeruleoalba* (delfín rayado), dos *Kogia sima* (cachalote enano), un *Delphinus delphis* (delfín común), un *Stenella longirostris* (delfín rotador), un *Grampus griseus* (delfín de Risso), un *Langenodelphis hosei* (delfín de Fraser) y un *Tursiops truncatus* (delfín nariz de botella). En la virtopsia y en la necropsia siete animales presentaron ventriculomegalia. *Brucella* spp. se aisló del líquido cefalorraquídeo en 14 animales, 11 aislamientos fueron de *Brucella ceti* ST26 y dos de *Brucella* spp. ST27. Se determinó un perfil de lesiones histopatológicas de acuerdo con el grado de severidad de la inflamación en diferentes sitios del sistema nervioso central, 14 animales presentaron meningoencefalitis con infiltrado linfocitario en

meninges e infiltrados periventriculares y perivasculares. *Brucella ceti* ST 26 fue el principal agente causal de las lesiones encontradas en el sistema nervioso central.

Palabras clave: Neurobrucelosis, *Brucella*, *Brucella ceti*, cetáceos, tomografía computarizada post mortem, virtopsia.

ABSTRACT

Cetaceans in Costa Rica include 30 known species, representing 33% of the world's diversity, cetacean strandings along the Pacific Ocean and the Caribbean Sea of the country shorelines are reported yearly. Stranded individuals constitute a valuable source of information to increase basic knowledge and determine the health status of cetacean populations, causes of death and disease, and assessing zoonotic agents' presence. The objective was to describe the anatomopathological findings in virtopsy, necropsy and histopathology, additionally, we perform ancillary bacteriologic testing in central nervous tissues of stranded cetaceans in Costa Rica from 2017-2021. During this period, the number of stranded cetaceans was 4-6 animals per year.

A total of 21 individuals of seven different cetacean species were evaluated. They included 14 *Stenella coeruleoalba* (striped dolphin), two *Kogia sima* (dwarf sperm whale), one *Delphinus delphis* (common dolphin), one *Stenella longirostris* (spinner dolphin), one *Grampus griseus* (Risso's dolphin), one *Langenodelphis hosei* (Fraser's dolphin) and one *Tursiops truncatus* (bottlenose dolphin). After virtopsy and at necropsy, seven animals presented ventriculomegaly. *Brucella* spp. was isolated from the cerebrospinal fluid in 14 animals, and 11 isolates were identified as *Brucella ceti* ST26 and two as *Brucella* spp. ST27. Histopathological lesions were determined according to the degree of the inflammation severity and changes in different anatomical locations of the central nervous system for each case, 14 animals presented lymphocytic meningoencephalitis with inflammation predominantly in meninges,

periventricular and perivascular spaces. *Brucella ceti* ST26 was the main causative agent of the lesions found in the central nervous system.

Keywords: Neurobrucellosis, *Brucella*, *Brucella ceti*, cetaceans, postmortem computed tomography, virtopsy.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes

Los cetáceos incluyen las ballenas, delfines y marsopas, todos mamíferos marinos altamente especializados que viven y realizan su ciclo de vida principalmente en los océanos y en algunos ríos del mundo (Ward et al. 2013). Estos animales se agrupan en los subórdenes Odontoceti, Mysticeti y Archaeoceti, este último ya extinto. Los misticetos son los mamíferos más grandes del planeta, incluyen 14 especies de ballenas barbadas sin dientes propiamente dichos, con dos espiráculos. Los odontocetos incluyen 76 especies, todos con dientes y un único espiráculo. Todos los cetáceos utilizan la ecolocación para cazar, localizar presas y conocer su entorno acuático (Cranford y Amundin 1996; McKenna et al. 2011; Jefferson et al. 2015). Los mamíferos marinos habitan tanto aguas oceánicas y costeras, de distribución restringida o estuarina (SINAC 2016, May-Collado et al. 2017).

La fauna de cetáceos se compone de 90 especies (Jefferson et al. 2015), de las cuales en Costa Rica se han confirmado 22 en el Océano Pacífico y nueve en el mar Caribe (May-Collado et al. 2017), representando el 33% y 39% de los cetáceos descritos en el mundo y en Latinoamérica respectivamente (Wehrtmann y Cortéz, 2009).

Los cetáceos en Costa Rica y en el mundo enfrentan una gran cantidad de amenazas tales como la contaminación local (el caso del Golfo de Nicoya) y global causada por la descarga de desechos urbanos, industriales y agrícolas, la pérdida de hábitat, la actividad pesquera con capturas accidentales o por colisiones con barcos,

el creciente turismo en torno a estos mamíferos y distorsión de sus sistemas de navegación por la contaminación acústica generada por el tráfico marítimo. Por otra parte, también tenemos otros factores como las enfermedades infecciosas, las cuales están asociadas al estrés y algunos de los factores anteriormente descritos. Todo lo anterior se encuentra asociado con los encallamientos y muertes de cetáceos, impactando así negativamente sus poblaciones, particularmente aquellos en peligro de extinción (Tanabe et al. 1994; Palacios y Gerrodette 1996; Rodríguez-Fonseca 2001; Hernández et al. 2012; Arbelo et al. 2013; Moore et al. 2013; Giorda et al. 2017, May Collado et al. 2017).

Los encallamientos ocurren generalmente en cetáceos heridos, enfermos o agotados cuando flotan cerca de la costa, encallando en aguas poco profundas (Geraci y Lounsbury 2005). El monitoreo sistemático de los encallamientos de cetáceos es un recurso valioso que sirve para generar información científica, médica y biológica de estos animales. Las necropsias, los estudios anatómo-histopatológicos y de imágenes, así como los análisis inmunológicos, de aislamiento e identificación de agentes infecciosos conocidos, son necesarios para obtener información debido a que son consideradas herramientas principales para el estudio de las causas de encallamiento, enfermedad y muerte de los cetáceos (Geraci y Lounsbury 2005; Gulland et al. 2018).

Entre las infecciones asociadas a los encallamientos, morbilidad y mortalidad de los cetáceos, están aquellas que afectan al sistema nervioso central (SNC). Morbillivirus es el principal agente viral causante de encefalitis en cetáceos. La infección por este Paramixovirus puede generar neumonía multifocal a difusa intersticial severa y meningoencefalitis desmielinizantes no supurativas. Los animales

que sobreviven a la etapa aguda de la infección pueden morir posteriormente debido a infecciones oportunistas que pueden colonizar el cerebro (Stephens et al. 2014; Kennedy 1991, Gulland et al. 2018), causadas por agentes como el hongo *Aspergillus* spp. (Domingo et al. 1992; Stephens et al. 2014), y *Toxoplasma gondii*, un protozoario que infecta a una gran variedad de mamíferos en todo el mundo, este último también puede comportarse como patógeno primario causando aborto, enfermedad sistémica letal y encefalitis no supurativa (Di Guardo et al. 2010; Sierra et al. 2014, Gulland et al. 2018).

Las bacterias del género *Brucella* son capaces de infectar y causar la muerte de diferentes tipos de cetáceos. *Brucella ceti* es el principal agente etiológico y raramente se ha descrito *B. pinnipedialis* afectando estos animales (Davison et al. 2021a). En el caso de *B. ceti* se han descrito patologías relacionadas como meningoencefalitis no supurativa severa e hidrocefalia secundaria, bronconeumonía, endocarditis, discoespondilitis y osteoartritis fibrinopurulenta en articulaciones de la columna vertebral, placentitis y abortos (Miller et al. 1999; Sierra et al. 2014, Cowan et al. 2010, Dagleish et al. 2008, Foster et al. 2002, Galatius et al. 2009, González-Barrientos et al. 2010, Groussaud et al. 2007, Hernández-Mora et al. 2013).

Actualmente se ha logrado aislar tanto de cetáceos como de humanos *Brucella* marina caracterizada como ST27. Las infecciones en cetáceos por *Brucella* ST27, causa patologías severas semejantes a *B. ceti* (Hernández-Mora et al. 2021). Los casos humanos causados por *Brucella* ST27 reportados en Perú y Nueva Zelanda (ambos reportes en países con costas del Océano Pacífico) presentaron granulomas intracerebrales, mialgia severa, fatiga, sinusitis severa, osteomielitis espinal, pérdida

de conciencia, dolor de espalda, fiebre intermitente, sudores nocturnos profusos, anorexia y pérdida de peso (Sohn et al. 2003; Mc Donald et al. 2006; Van Bresseem et al. 2009).

En nuestro país se empezó a estudiar la patología en los delfines rayados (*Stenella coeruleoalba*) encallados en el año 1999 (dos casos) y luego en el 2003 (tres casos), evidenciándose la presencia de meningoencefalitis no supurativa. Según reportes del Departamento de Patología de la Escuela de Medicina Veterinaria (EMV), los análisis fueron negativos para la presencia de Morbillivirus de acuerdo con la inmunohistoquímica realizada en la Escuela Superior de Medicina Veterinaria de Hannover, Alemania.

A partir del año 2004, se realizaron los primeros estudios serológicos para la detección de anticuerpos contra brucelas lisas, aislándose en el año 2006, *B. ceti* del líquido cefalorraquídeo de una hembra adulta de delfín rayado encallada en Playa Tambor, Puntarenas (Hernández Mora et al. 2008). La presentación clínica de este animal estuvo asociada con síntomas como la falta de coordinación para el nado, problemas de flotabilidad y convulsiones (González-Barrientos 2008, Hernández- Mora et al. 2008). A partir de esta fecha se han hecho amplios estudios bacteriológicos, epidemiológicos y serológicos sobre *B. ceti* en los cetáceos encallados en Costa Rica (Guzmán-Verri et al. 2012, Hernández-Mora et al. 2017a).

La mayoría de estas investigaciones han sido el resultado de colaboraciones entre Servicio Nacional de Salud Animal (SENASA), el Programa de Investigación en Enfermedades Tropicales (PIET) de la EMV, la Fundación Keto, el Servicio Nacional

de Guardacostas, el Parque Marino del Pacífico, el Servicio 911, el Sistema Nacional de Areas de Conservación, y las Municipalidades.

1.2. Justificación

Los cetáceos reflejan variaciones ecológicas en diferentes áreas geográficas y escalas temporales; por tanto, son centinelas de las cadenas tróficas de los ecosistemas marinos (Moore 2008, Gulland et al. 2018).

Conocer el estado de las poblaciones de cetáceos en el mundo es crítico para la conservación, protección y el fortalecimiento de las investigaciones. Estas acciones son aún más importantes para las especies en peligro de extinción, ya que existe un vacío de datos para al menos 38 especies de cetáceos, según la “lista roja” de especies amenazadas de la Unión Internacional para la conservación de la Naturaleza (UICN) (Mancia 2018). De las especies reportadas para nuestro país en el Apéndice I de la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres (CITES), están las especies con mayor en peligro de extinción que son *Sotalia fluviatilis*, *Physeter macrocephalus*, *Hyperoodon planifrons* y todos los balenopteridos. Por otro lado, el Apéndice II lo conforman las demás especies, las cuales no están necesariamente amenazadas de extinción, pero que podrían llegar a estarlo a menos que se controle estrictamente su comercio (Nowak 1991).

Por esta razón, es necesario estudiar las razones por las que los cetáceos que encallan en las costas y las razones por las cuales se enferman y mueren.

La virtopsia (necropsia virtual) es una herramienta complementaria a la necropsia convencional, ya que permite identificar diferentes alteraciones, y sus relaciones con

los demás órganos y tejidos, por tanto, complementaria a la necropsia y a otros estudios. La virtopsia es de particular interés cuando los animales rescatados están en diferentes grados de descomposición (grados 2 y 3). En el caso de cetáceos con neurobrucelosis, la virtopsia puede revelar microfracturas o patologías óseas difícilmente identificadas en la necropsia, tales como cóndilos occipitales ausentes en animales afectados, procesos vertebrales dorsales o laterales alterados, pérdida de una arquitectura normal del hueso liso, así como una considerable remodelación en huesos como el atlas y otras alteraciones reportadas anteriormente (Dagleish et al. 2007; Baglivo et al. 2013). Es decir, aunque la necropsia “es el patrón oro” para la revelar la *causa mortis*, las modalidades de diagnóstico por imagen complementan el diagnóstico final (Grabherr et al. 2014; Heinemann et al. 2015).

1.2.1. Importancia

El número de cetáceos en Costa Rica representa el 33% de las especies conocidas. Desde el 2004 al 2016 el número de encallamientos en nuestras costas fue de 115 individuos de 16 especies diferentes, de las cuales 54 individuos de seis especies presentaron anticuerpos contra *Brucella* spp. y varios de ellos presentaron patologías neuronales y murieron a causa de esta infección (Hernández-Mora et al. 2017b), por lo que la neurobrucelosis es una causa importante de encallamiento. Por tanto, es necesario comprender el impacto de esta enfermedad en las poblaciones de cetáceos, buscando generar medidas de prevención para las infecciones humanas, así como las de otros animales.

Tomando en cuenta el número de reportes de cetáceos con brucelosis en Costa Rica y el potencial zoonótico que tiene esta infección (Suárez et al. 2017), es necesario que las autoridades de salud animal y humana monitoreen los encallamientos que resultan por esta enfermedad para garantizar la salud pública.

La presente práctica dirigida es necesaria para comprender los alcances sobre la patología de de la neurobruceosis en cetáceos y los posibles riesgos que podrían tener este tipo de infecciones para los humanos y otros animales.

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo General

Describir las lesiones anatomopatológicas y la bacteriología de los cetáceos encallados en las playas de Costa Rica durante el periodo 2017-2021, por medio de virtopsia, necropsia, cultivos bacteriológicos e histopatología del sistema nervioso central.

1.3.2. Objetivos Específicos

1. Interpretar la virtopsia del sistema nervioso central de los cetáceos encallados por medio de tomografía axial computarizada.
2. Evaluar las lesiones del sistema nervioso central de los cetáceos encallados mediante la realización de necropsias.
3. Identificar la presencia de microorganismos, en particular los del género *Brucella*, en el sistema nervioso central mediante la realización del cultivos y caracterización bacteriológica.
4. Describir la histopatología de las lesiones del sistema nervioso central de los cetáceos encallados.

2. METODOLOGÍA

El SENASA mediante el Programa Nacional de Fauna Silvestre a través de la Ley General del Servicio Nacional de Salud Animal 8495, se encarga de la vigilancia de enfermedades de cetáceos que encallan en las playas costarricenses. Como parte de esta labor de vigilancia de enfermedades, los especímenes de animales encallados son recolectados y transportados para ser sometidos a diferentes estudios como se describen en esta práctica dirigida.

2.1. Área de estudio

Para el desarrollo de esta práctica dirigida se tomó en cuenta todos los cetáceos encallados e identificados que se encontraron en Costa Rica a lo largo del litoral del Océano Pacífico (1016 Km) y del mar Caribe (212 Km).

2.2. Tipo de estudio

Durante la práctica dirigida se realizó un estudio transversal cuyo propósito es describir la etiología por bacteriología y las lesiones anatomopatológicas por virtopsia, necropsia, histopatología de los cetáceos encallados en las playas de Costa Rica.

2.3. Población estudiada

Los casos estudiados en esta práctica dirigida corresponden a cetáceos encallados desde enero del 2017 hasta finales de marzo del 2021 (Cuadro 1). Los casos anteriores al 2020 se evaluaron de manera retrospectiva tomando en cuenta evidencia escrita, fotográfica o de otros archivos digitales con o sin afecciones en el SNC, según los datos obtenidos por virtopsia, necropsia, bacteriología e histopatología.

Cuadro 1. *Identificación de los casos encallados durante el periodo 2017-2021.*

Caso	AKA	Protocolo SENASA	Consecutivo	Especie	Edad	Género	Año encallamiento
1	Eduardito	D1553-17	CR 08-17	<i>Delphinus delphis</i>	A	M	2017
2	OC	D1554-17	CR 06-17	<i>Stenella coeruleoalba</i>	A	M	2017
3	Chiibal Kiin	D1807-17	CR 13-17	<i>Stenella coeruleoalba</i>	A	M	2017
4	Irmo	D2032-17	CR 16-17	<i>Stenella coeruleoalba</i>	A	M	2017
5	Vico	D0055-18	CR 22-17	<i>Stenella longirostris</i>	C	M	2017
6	Fernanda	D0056-18	CR 01-18	<i>Stenella coeruleoalba</i>	C	H	2018
7	Julián	D0423-18	CR 03-18	<i>Stenella coeruleoalba</i>	J	M	2018
8	Kathy	D0612-18	CR 06-18	<i>Kogia sima</i>	A	H	2018
9	Herradura	D0612-18	CR 07-18	<i>Kogia sima</i>	C	H	2018
10	Hellen	LSE 316-18	CR 15-18	<i>Stenella coeruleoalba</i>	A	H	2018
11	Raúl	D0096-19	CR 20-18	<i>Stenella coeruleoalba</i>	A	M	2018
12	Aníbal	CR 02-19	CR 02-19	<i>Grampus griseus</i>	A	M	2019
13	Randy	D4166-19	CR 05-19	<i>Stenella coeruleoalba</i>	A	H	2019
14	María José	D4166-19	CR 07-19	<i>Stenella coeruleoalba</i>	A	H	2019
15	Yen	D1911-20	CR 03-20	<i>Stenella coeruleoalba</i>	A	M	2020
16	Ana	D3508-20	CR 04-20	<i>Stenella coeruleoalba</i>	A	H	2020
17	María	D3508-20	CR 05-20	<i>Stenella coeruleoalba</i>	C	H	2020
18	Covid	D3509-20	CR 08-20	<i>Stenella coeruleoalba</i>	A	M	2020
19	Hernán	D3510-20	CR 09-20	<i>Langenodelphis hosei</i>	A	M	2020
20	Francisco	D4826-20	CR 10-20	<i>Stenella coeruleoalba</i>	A	M	2020
21	Tammy	D0329-21	CR 01-21	<i>Tursiops truncatus</i>	A	H	2021

AKA, del inglés “also known as”; A, adulto; J, juvenil; C, cría; M, macho; H, hembra.

Se analizaron retrospectivamente muestras e información de nueve delfines rayados (*Stenella coeruleoalba*), un delfín común (*Delphinus delphis*), un delfín rotador (*Stenella longirostris*), dos cachalotes enanos (*Kogia sima*), un delfín de Riso (*Grampus griseus*) que encallaron en diferentes playas del país durante el periodo 2017-2019 (Cuadro 1, 2 y Figura 1). De estos animales se recopilaron los hallazgos de necropsia, bacteriología e histopatología, asimismo se incluyeron imágenes de virtopsias realizadas en cinco animales (cuatro delfines rayados y un delfín rotador).

Cuadro 2. Identificación de las diferentes especies incluidas en la práctica dirigida.

Espece	Número de casos	Espece	Número de casos
 <i>Stenella coeruleoalba</i>	14	 <i>Stenella longirostris</i>	1
 <i>Kogia sima</i>	2	 <i>Tursiops truncatus</i>	1
 <i>Delphinus delphis</i>	1	 <i>Langenodelphis hosei</i>	1
 <i>Grampus griseus</i>	1		

Imágenes adaptadas de: Jefferson et al. 2015.

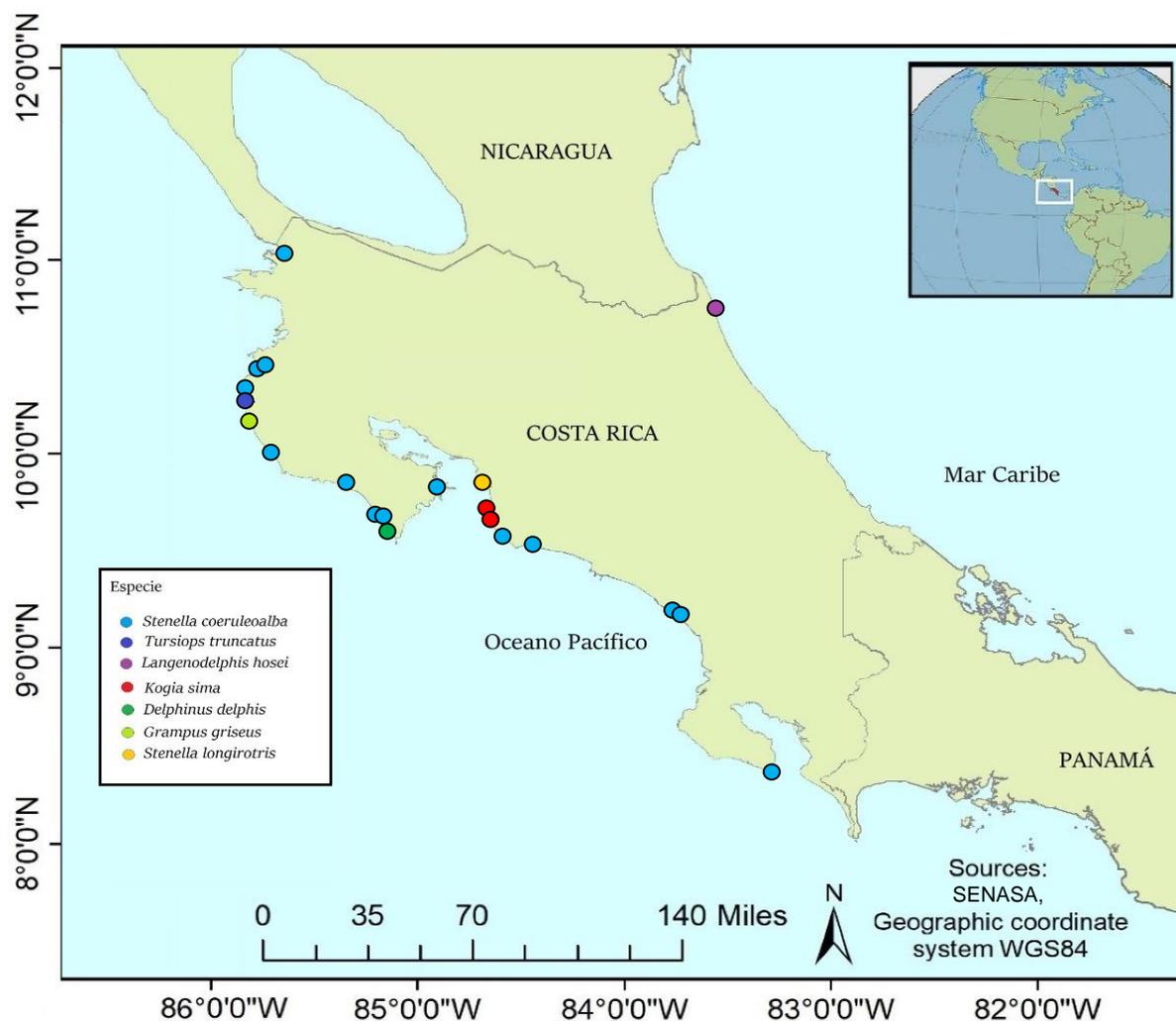


Figura 1. Ubicación de cetáceos encallados en Costa Rica durante el periodo 2017-2021, según la especie.

Durante el desarrollo de esta práctica dirigida se trabajó con cinco delfines rayados, un delfín de Fraser (*Langenodelphis hosei*) y un delfín nariz de botella (*Tursiops truncatus*) que encallaron en las diferentes playas del Pacífico y el Caribe nacional, entre enero del 2020 hasta finales de marzo del 2021 (Cuadro 1, 2 y Figura 1). A cada uno de los siete cetáceos que encallaron se le realizaron estudios de virtopsia, necropsia, bacteriología e histopatología.

2.4. Envío y almacenamiento de animales

Los animales fueron remitidos al Laboratorio de Bacteriología del SENASA desde las diferentes playas del país, en bolsas de transporte de cadáveres, debidamente cerradas para evitar el contacto directo o derrames de secreciones durante el viaje y manipulación de estos. En caso de no poderse procesar inmediatamente, los animales fueron almacenados en congelador -20°C para su estudio posterior.

2.5. Virtopsia

Todos los animales se llevaron a la Clínica Veterinaria VicoVet ubicada en Sabanilla, San José, en donde se realizó la tomografía. El equipo utilizado para la virtopsia fue el tomógrafo Siemens modelo SOMATOM Scope® 2014. El escaneo se realizó a 130 kV, de 23 a 25 mA y 1.50 mm de grosor en el corte. El campo de visión de escaneo (sFOV) varió de 334 a 500 mm. Este escáner cuenta con dimensiones máximas de dos metros de largo y soporta hasta un peso de 200 kilogramos.

La tomografía se realizó *post mortem* (TACPM) en un total de 12 animales. Cinco casos correspondieron a virtopsias realizadas durante el periodo 2017-2019 y los otros siete casos fueron los tomados durante el periodo enero 2020-marzo 2021. Después de realizar la TACPM, las imágenes se enviaron al Dr. Brian Kot de City University en Hong Kong, del Laboratorio de Virtopsia de Animales Acuáticos, el que realizó el análisis de las tomografías.

2.5.1. Hallazgos del sistema nervioso central

Para observar las lesiones del SNC fue necesario utilizar la reconstrucción imágenes de TACPM con el visualizador RadiAnt™ DICOM Viewer, mediante la herramienta “Reconstrucción multiplanar 3D (3D MPR)”. Esta herramienta se puede

utilizar para reconstruir imágenes en planos arbitrarios (oblicuos), se utilizó la reconstrucción en planos ortogonales (transversal, dorsal y sagital).

Los hallazgos del SNC en cada animal se dividieron cualitativamente en casos sin alteraciones, casos leves, casos moderados y casos severos, según el grado de lesión de los ventrículos agrandados. En caso de que en las imágenes se identificara ventriculomegalia se realizó la evaluación mediante el índice de Evans y el ángulo calloso.

2.5.1.1. Índice de Evans

El índice de Evans (IE) se estimó mediante la relación calculada al dividir el ancho máximo de los cuernos anteriores de los ventrículos laterales (A) entre el ancho biparietal máximo del cráneo interno (B), al mismo nivel ($IE = A/B$). Las medidas se tomaron utilizando el botón "Región de interés (ROI)" con la herramienta "Largo" del visualizador RadiAnt™ DICOM Viewer, mediante la reconstrucción de imágenes 3D MPR dorsales de TACPM en cada animal que presentaba ventriculomegalia.

2.5.1.2. Ángulo Calloso

El ángulo calloso (AC) describe el ángulo entre el cuerpo calloso como centro y las superficies internas dorsomediales de los ventrículos laterales en una imagen transversal para lograr esto en cetáceos se utilizaron imágenes reconstruidas transversalmente en dos sitios anatómicos, la región peribullar y región mandibular. Las mediciones se realizaron utilizando el botón "ROI" con la herramienta "Ángulo" del visualizador RadiAnt™ DICOM Viewer, utilizando la reconstrucción de imágenes 3D MPR transversales de TACPM en cada animal que presentaba ventriculomegalia.

2.5.2. Hallazgos del sistema osteoarticular

Se evaluaron posibles lesiones del sistema osteoarticular (SOA), para esto se utilizó la reconstrucción de imágenes de TACPM con el visualizador RadiAnt™ DICOM Viewer, mediante la herramienta 3D MPR y también se utilizó otra herramienta llamada “Renderización de volumen 3D (3D VR)”, esta herramienta se utiliza para visualizar grandes volúmenes de datos generados por los escáneres como TAC en un espacio tridimensional y el conjunto de datos se pueden explorar de manera interactiva.

2.6. Necropsia y recolección de muestras

Se evaluaron las necropsias de 21 casos, 14 pertenecían a las necropsias realizadas durante el periodo 2017-2019, de estos se obtuvieron fotografías de los hallazgos del SNC durante la necropsia, los otros siete casos correspondieron a necropsias realizadas de los animales encallados desde enero 2020 hasta marzo 2021. Las necropsias se realizaron bajo las normas de seguridad y equipo recomendadas en “NVSL Guidelines for Necropsy”. Durante la necropsia, el SNC se examinó de manera visual y mediante palpación, se registraron todos los hallazgos asociados a alteraciones del SNC y se tomaron fotografías con una cámara digital Canon EOS Rebel T5i. El encéfalo en cada caso fue evaluado a nivel macro y extraído en su totalidad para la toma de muestras para los correspondientes estudios de bacteriología e histopatología (Figura 2).



Figura 2. *Vista dorsal del sistema nervioso central extraído en necropsia de AKA Francisco.*

2.7. Bacteriología

El examen bacteriológico se realizó de las muestras obtenidas de la necropsia, para esto se utilizó la mitad del SNC extraído, cada tejido evaluado tenía un tamaño aproximado de 5 cm³, los que se cortaron y se metieron de forma estéril a una bolsa para muestras Whirl-Pak®. Posteriormente se tomaron muestras de hisopados ventriculares y en lo posible LCR por aspirado con jeringa de los ventrículos laterales y posteriormente se almacenó en tubos cónicos estériles. Cada muestra fue

identificada con el nombre del caso, fecha y lugar, posteriormente se mantuvieron de 2°C a 4 °C.

Después de terminar la necropsia de cada animal, se procedió a procesar las muestras para el análisis bacteriológico.

2.7.1. Cultivos bacteriológicos

El cultivo y las técnicas bacteriológicas para identificar bacterias del género *Brucella*, a partir de cultivos de muestras de cetáceos, son consideradas como pruebas especializadas y deben ser realizadas por laboratorios capacitados para la realización de estas pruebas.

Las colonias de *Brucella ceti* tienen una apariencia morfológica típica de otros miembros del género, son pequeñas, elevadas, convexas y brillantes, con un margen completo, de color miel y translúcidas cuando se observan a contra la luz en medios translúcidos como el CITA y Farrell, además, son resistentes al ácido mediante la tinción de Ziehl-Neelsen modificada y se aglutinan con los antisueros de *Brucella abortus* en las pruebas de portaobjetos (Foster et al. 2007, Foster et al. 2011).

El medio de Farrell y CITA se usan comúnmente para el aislamiento bacteriológico de *Brucella* spp. en animales domésticos (De Miguel et al. 2011) el medio CITA contiene colistina, vancomicina, nistatina, nitrofurantoína, anfotericina B para inhibir contaminantes sin inhibir el crecimiento de *Brucella* spp. (De Miguel et al. 2011), por otro lado, el medio Farrell contiene ácido nalidíxico, bacitracina, cicloheximida, nistatina, polimixina B y vancomicina que previene el crecimiento de hongos y bacterias comensales y ambientales que comúnmente contaminan las muestras durante la recolección. Ambos medios recomendados por la OIE resultan con alta

sensibilidad y especificidad para los aislamientos de brucelas marinas provenientes de animales con un grado de descomposición leve y moderado (código 2 y 3).

Las muestras fueron inoculadas en medio no selectivo (agar sangre), y en medios selectivos (medio Farrell y medio CITA). Todas las placas se incubaron con CO₂ al 10% a 37°C durante 4-7 días, después de este tiempo los cultivos donde crecieron unidades formadoras de colonias (UFC) compatibles con *Brucella* spp. fueron aislados nuevamente en agar sangre y se incubaron en CO₂ al 10% a 37°C durante otras 24-72 horas. Los cultivos compatibles fueron teñidos con Tinción Gram y paralelamente se analizó la actividad de oxidasa y de ureasa en estas bacterias. Las bacterias compatibles se enviaron al Laboratorio de Bacteriología de la EMV, Universidad Nacional para realizar pruebas bioquímicas y fenotípicas adicionales para confirmar o descartar el género *Brucella*. Se realizaron pruebas como: la de aglutinación con tintes de acriflavina y naranja de acridina, reducción de nitratos, utilización de citrato, producción de H₂S, crecimiento en presencia y ausencia de CO₂, tionina (20 µg/mL), fucsina básica (20 µg/mL) y captación de cristal violeta, todos protocolos descritos anteriormente (Alton et al. 1988). Luego se procedió a preparar cultivo puro de las brucelas aisladas en medio líquido no selectivo (tripticosa soya), el cual se incubó a 37°C durante otras 48-96 horas para luego realizar las pruebas moleculares y ser almacenadas cada una a -80 °C con 30% de glicerol para su conservación en bacteriotecas tanto del Laboratorio de Bacteriología del SENASA como de la EMV (Alton et al. 1988).

2.7.2. Caracterización molecular

Aunque los aislamientos de *B. ceti* se incluyen en una sola especie, estos se pueden separar en diferentes grupos, identificados por tipos de secuencia (ST) utilizando caracterización genotípica MLST. La división de ST se realiza de acuerdo con rasgos genéticos distintos, es así como se describe *B. ceti* tipo delfín ST26, tipo marsopa *B. ceti* ST23 y *Brucella* spp. tipo humano ST27 la cual no es posible clasificarla ni como *B. ceti* o *B. pinnipedialis*.

En esta práctica dirigida, inicialmente se utilizó el PCR múltiple conocido como Bruce-ladder, para su clasificación como especie de *Brucella* marina diferente a las terrestres tal y como lo recomienda la OIE (López-Goñi et al. 2008, OIE 2009). Además, se utilizó análisis el número variable de loci múltiples de repeticiones en tándem (MLVA) y la tipificación de secuencia multilocus (MLST) para definir el perfil de ST utilizando el análisis de secuenciación del genoma completo (WGS) (Dawson et al. 2008).

2.8. Histopatología

Para evaluar la histopatología del SNC en las diferentes especies y los animales negativos y positivos a *Brucella* spp. según el tipo de secuencia (ST), se realizaron estudios retrospectivos y prospectivos de los perfiles de las lesiones del SNC de los cetáceos a los que se les hizo necropsia durante el periodo 2017-marzo 2021 de acuerdo con las técnicas descritas anteriormente (González-Barrientos et al. 2010). Después de la necropsia de cada caso, uno de los de los hemisferios cerebrales fue

fijado y conservado por inmersión en formalina buferada al 10% con pH neutro, a temperatura ambiente y con un volumen diez veces mayor al tamaño de la muestra.

2.8.1. Procesamiento de tejidos

De los cerebros procesados se tomaron las siguientes posiciones anatómicas del SNC: médula espinal, médula oblongada, puente, colículos caudales, colículos rostrales, tálamo, núcleos basales, cerebelo, corteza occipital, corteza parietal, corteza frontal. De cada tejido se realizó un corte transversal a nivel macro (Figura 3), luego se procesó de manera rutinaria (González-Barrientos et al. 2010) para la deshidratación, aclaramiento e infiltración, después se incluyeron en parafina y posteriormente se realizaron los cortes micro (5 μ m). Los cortes se montaron en portaobjetos de vidrio para microscopio y se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E).



Figura 3. Corte transversal macro de la corteza frontal del SNC de Hernán.

2.8.2. Escaneo y graduación de lesiones

Para la evaluación de los diferentes tejidos del SNC, fue necesario escanear láminas de casos incluidos en la práctica dirigida, se utilizó el escáner para portaobjetos de patología digital Aperio LV1 de Leica Biosystems. Para la graduación del perfil de las lesiones se tomó en cuenta principalmente el infiltrado linfocítico por lo que se hizo el conteo de las capas celulares linfocíticas perivasculares y en meninges, según la cantidad de capas en cada una de las ubicaciones del SNC. Con base en lo anterior, se estableció una escala de severidad del 0 a 3, tomando en cuenta las lesiones presentes, las cuales correspondían a 0-ninguna (0 capas), 1-leve (1-3 capas), 2-moderada (4-7capas) y 3-severa (> 7 capas). Los resultados de la graduación de la severidad en las lesiones de cada uno de los casos se graficaron para proporcionar un perfil de lesión asociado a cada área del SNC. También se identificaron otras lesiones asociadas a la neurobrucelosis.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Estudios de tomografía

De los 12 especímenes evaluados mediante TACPM, se obtuvieron cinco sin alteraciones (AKA Vico, Yen, Ana, María, Tammy), mientras que los demás presentaron ventriculomegalia sugestiva a hidrocefalia, los cuales corresponden a tres animales con ventriculomegalia leve (AKA Julián, Hernán y Francisco), dos animales con ventriculomegalia moderada (AKA Randy y María José) y dos animales con ventriculomegalia severa (AKA Fernanda y Covid).

La virtopsia en cetáceos por medio de TACPM ha sido utilizada anteriormente en países como Hong Kong para descripción morfológica de alteraciones del cráneo y del cerebro de cetáceos encallados, sin incluir ningún agente patológico asociado (Chan et al. 2017; Yuen et al. 2017; Kot et al. 2020).

Los estudios de neurobrucelosis por TACPM en humanos son comunes (Al-Sous et al. 2004, González et al. 2010); sin embargo, los hallazgos encontrados en esta práctica dirigida son los primeros realizados en cetáceos con neurobrucelosis por medio de TACPM descrita en la literatura de la Medicina Veterinaria.

3.1.1. Hallazgos del SNC

3.1.1.1. Casos sin alteraciones

Se obtuvieron cinco casos sin alteraciones en el SNC, los cuales correspondieron a los casos AKA Vico, Yen, Ana, María y Tammy, estos cinco animales no presentaron ventriculomegalia (Figuras 4, 5 y 6).

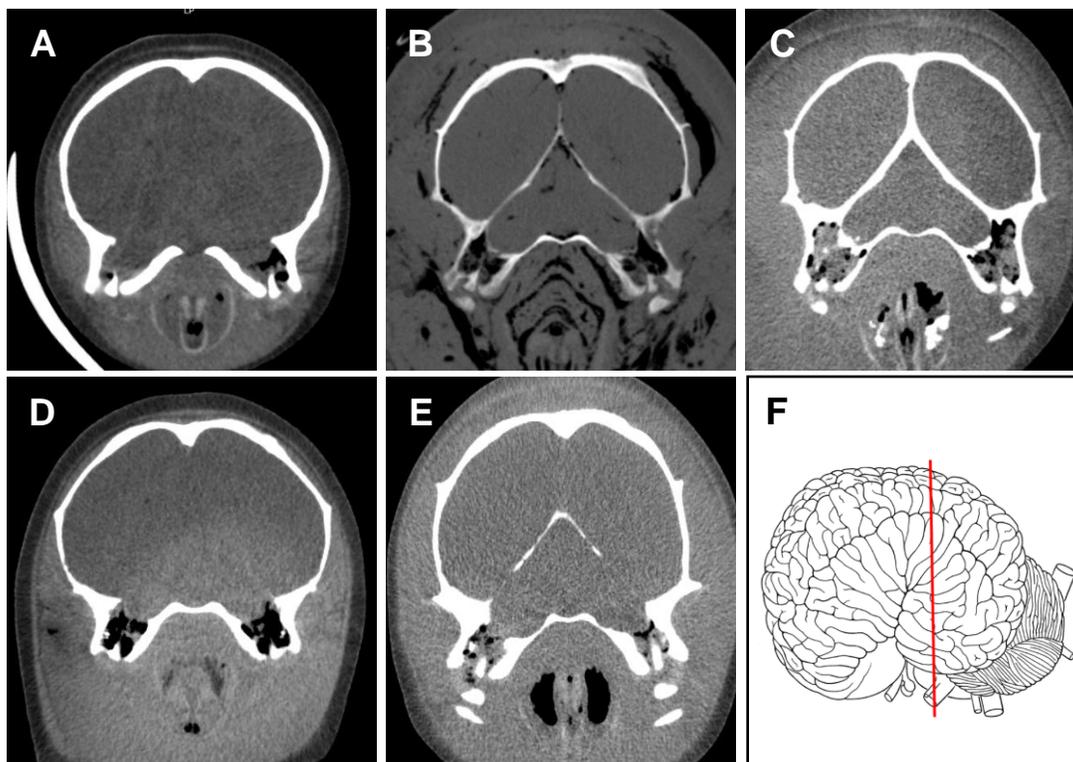


Figura 4. *Reconstrucción de imágenes transversales por TACPM del SNC en un corte transversal.* (A) Vico, (B) Yen, (C) Ana, (D) María y (E) Tammy, sin alteraciones evidentes en el SNC. (F) Imagen lateral del cerebro adaptada de: Cozzi et al. 2016. La Línea roja corresponde al nivel de corte transversal utilizado.

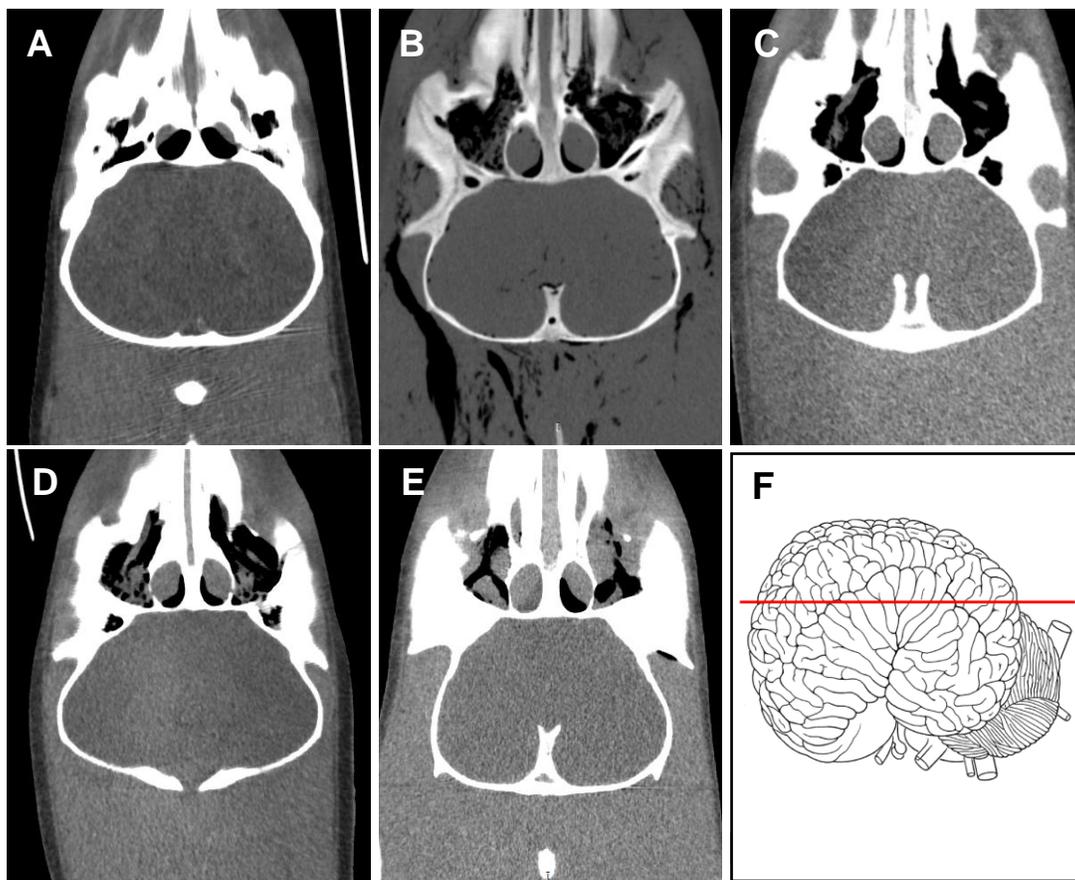


Figura 5. Reconstrucción de imágenes dorsales por TACPM del SNC en un corte dorsal. (A) Vico, (B) Yen, (C) Ana, (D) María y (E) Tammy, sin alteraciones evidentes en el SNC. (F) Imagen lateral del cerebro adaptada de: Cozzi et al. 2016. La Línea roja corresponde al nivel de corte dorsal utilizado.

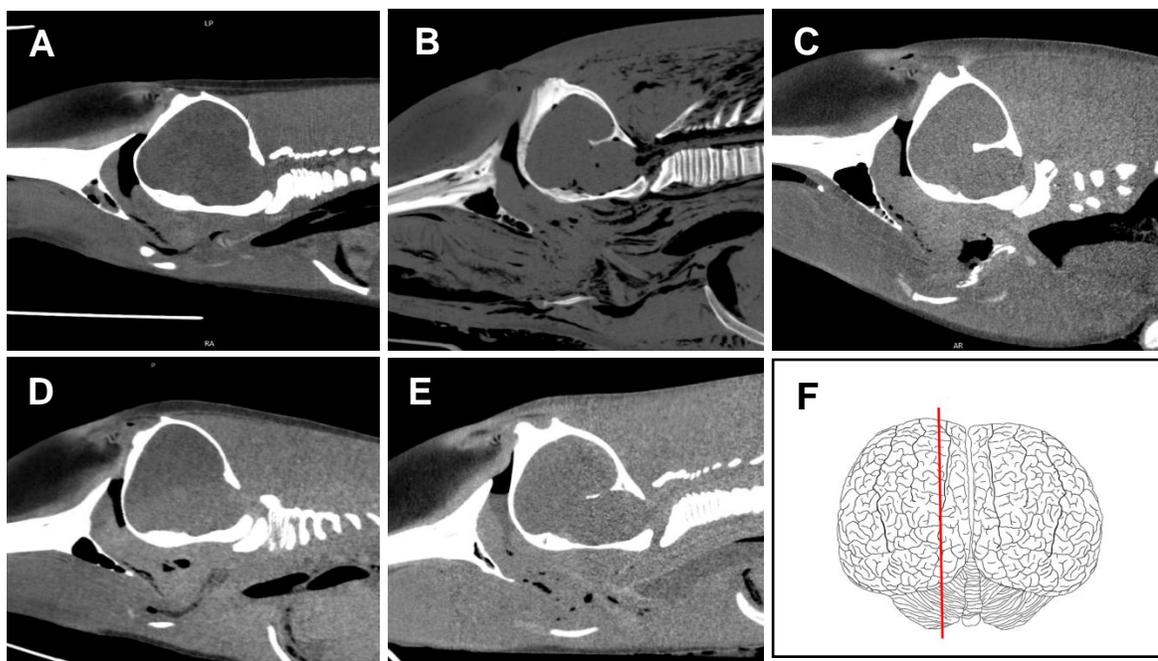


Figura 6. Reconstrucción de imágenes sagitales por TACPM del SNC en un corte sagital. (A) Vico, (B) Yen, (C) Ana, (D) María y (E) Tammy, sin alteraciones evidentes en el SNC. Imagen dorsal del cerebro adaptada de: Cozzi et al. 2016. La Línea roja corresponde al nivel de corte sagital utilizado.

Estudios pioneros de neuroimagen en cerebros de cetáceos mediante TACPM, indican que los ventrículos normalmente son apenas identificables, a menos de que haya alguna lesión evidente (Kot et al. 2020), por lo tanto, los animales identificados sin alteraciones en el SNC brindan información valiosa para considerar las posibilidades de que haya algún daño ocasionado por enfermedad o lesión que afecte la conformación normal de los ventrículos cerebrales.

3.1.1.2. Casos con ventriculomegalia leve

Se obtuvieron tres casos con ventriculomegalia leve, que corresponden a los casos de AKA Julián, Hernán y Francisco. Estos tres animales presentaban acumulación de LCR en pequeñas cantidades en los ventrículos laterales, sin mostrar una ventriculomegalia evidente (Figuras 7, 8 y 9).

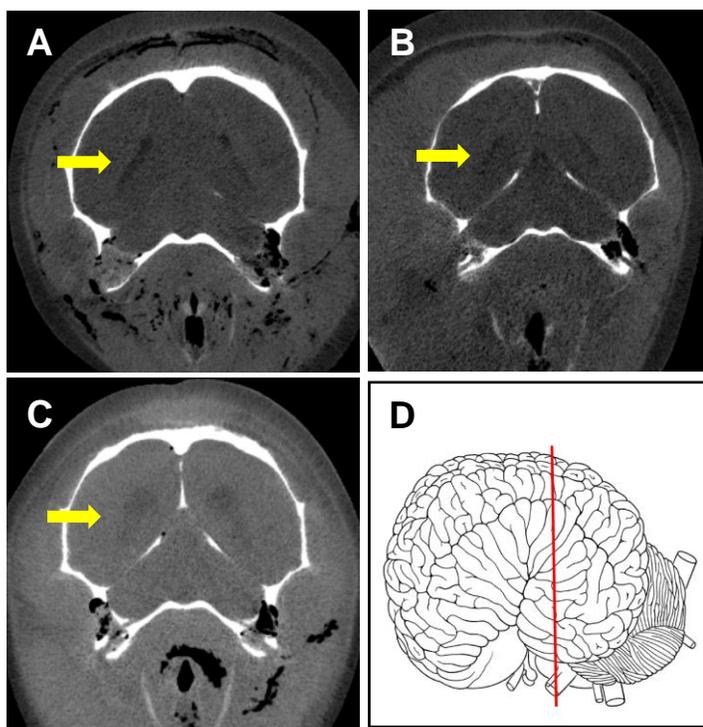


Figura 7. *Reconstrucción de imágenes transversales por TACPM del SNC en un corte transversal.* (A) Julián, (B) Hernán y (C) Francisco, con ventriculomegalia leve (flechas). (D) Imagen lateral del cerebro adaptada de: Cozzi et al. 2016. La Línea roja corresponde al nivel de corte transversal utilizado.

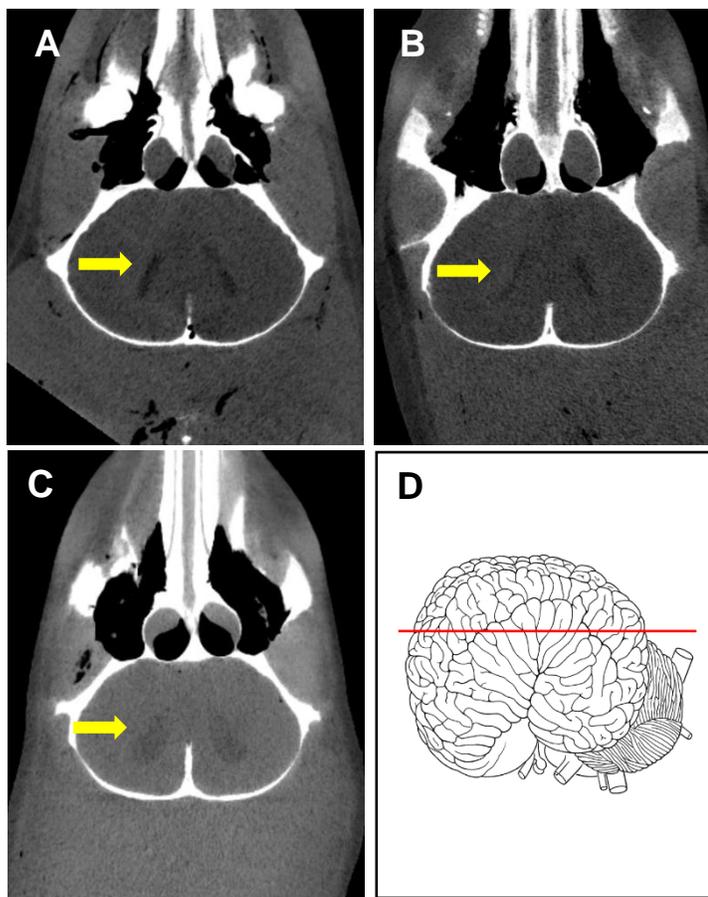


Figura 8. *Reconstrucción de imágenes dorsales por TACPM del SNC en un corte dorsal. (A) Julián, (B) Hernán y (C) Francisco con ventriculomegalia leve (flechas). (D) Imagen lateral del cerebro adaptada de: Cozzi et al. 2016. La Línea roja corresponde al nivel de corte dorsal utilizado.*

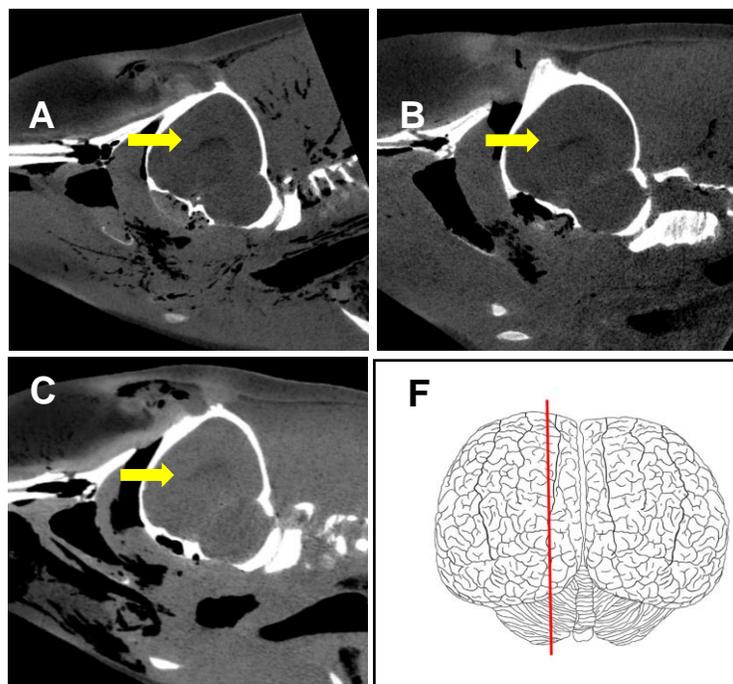


Figura 9. *Reconstrucción de imágenes sagitales por TACPM del SNC en un corte sagital.* (A) Julián, (B) Hernán y (C) Francisco, con ventriculomegalia leve (flechas). (F) Imagen dorsal del cerebro adaptada de: Cozzi et al. 2016. La Línea roja corresponde al nivel de corte sagital utilizado.

En el caso del delfín de Fraser (Hernán), a pesar de que presentó igualmente ventriculomegalia y serología positiva a brucelosis, no presentó ningún otro hallazgo de origen traumático, infeccioso ni inflamatorio, por lo tanto, se considera la ventriculomegalia leve como un hallazgo incidental.

En medicina humana se utilizan diferentes terminologías para identificar este tipo de ventriculomegalia en pacientes adultos, incluidas la ventriculomegalia oculta de larga duración del adulto (LOVA), estenosis acueductal con hidrocefalia, adultos con hidrocefalia congénita no tratada, síndrome de hidrocefalia en adultos jóvenes y de mediana edad, hidrocefalia congénita crónica y también hidrocefalia compensada,

cada una de estas posibles causas es determinada en conjunto con la evaluación clínica y de la sintomatología de cada paciente (Cowan et al. 2005, Hamilton 2009, Kiefer et al. 2005, Craven et al. 2019), en ausencia de este tipo de información y hallazgos relevantes se clasifica como ventriculomegalia idiopática, es necesario hacer más estudios en el futuro para determinar si es un hallazgo importante en la especie *L. hosei*.

3.1.1.3. Casos con ventriculomegalia moderada

Dos casos resultaron con ventriculomegalia moderada, correspondientes a AKA Randy y María José, ambos presentaron agrandamiento de los ventrículos laterales y el tercer ventrículo en la reconstrucción de imágenes transversales, dorsales y sagitales (Figuras 10, 11 y 12).

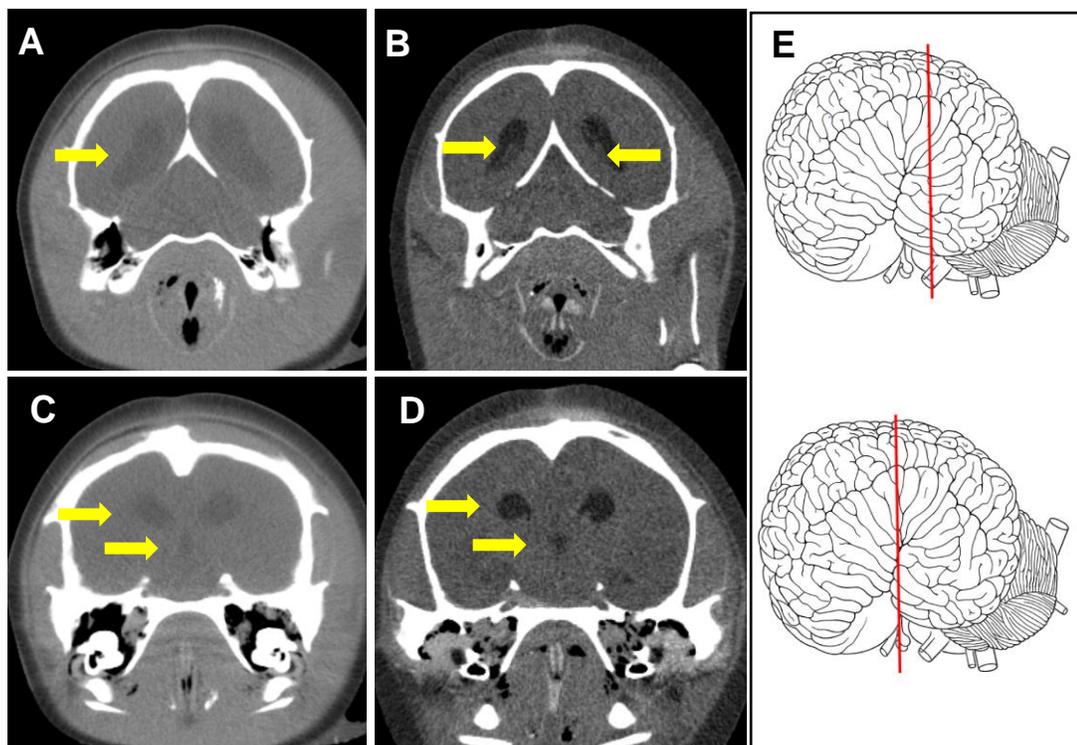


Figura 10. *Reconstrucción de imágenes transversales por TACPM del SNC en un corte transversal.* (A) Randy y (B) María José y agrandamiento de ventrículos laterales con el plexo coroideo, así como agrandamiento del tercer ventrículo de (C) Randy y (D) María José, ambos con ventriculomegalia moderada (flechas). (E) Imágenes laterales del cerebro adaptadas de: Cozzi et al. 2016. La Línea roja corresponde al nivel de corte transversal utilizado.

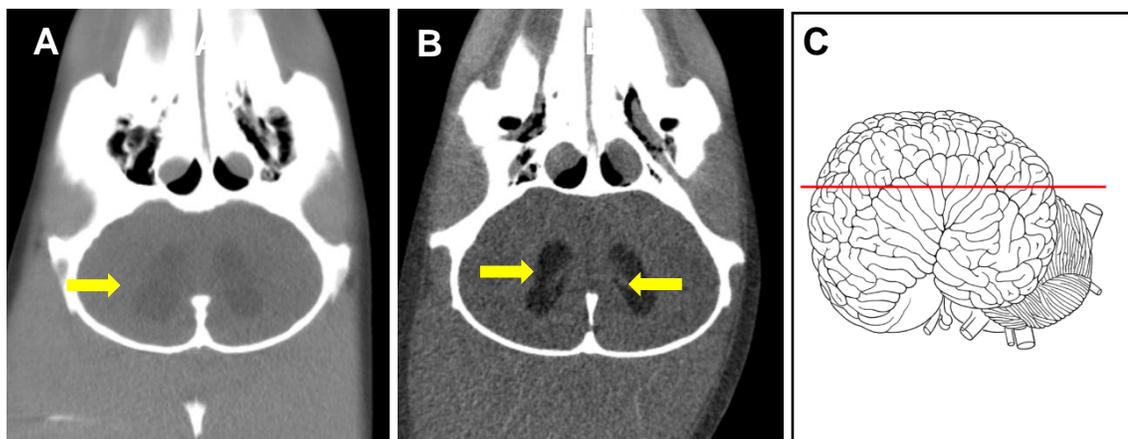


Figura 11. *Reconstrucción de imágenes dorsales por TACPM del SNC en un corte dorsal.* (A) Randy y (B) María José, con ventriculomegalia moderada y se observa agrandamiento de ventrículos laterales con el plexo coroideo (flechas). (C) Imagen lateral del cerebro adaptada de: Cozzi et al. 2016. La Línea roja corresponde al nivel de corte dorsal utilizado.

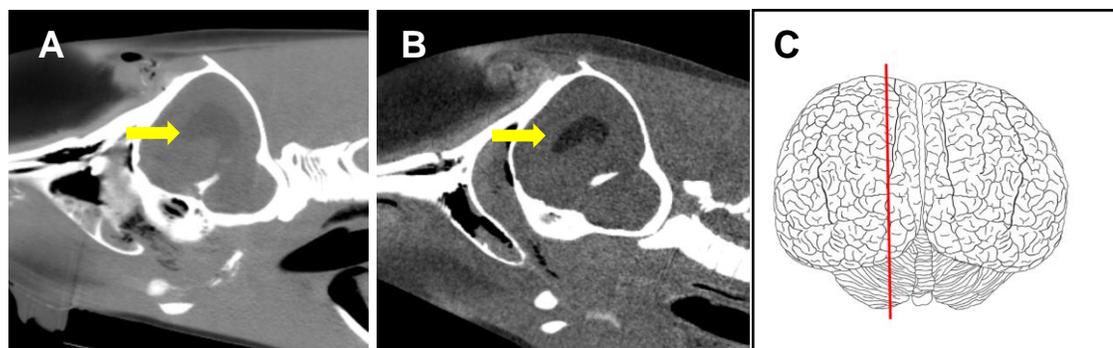


Figura 12. *Reconstrucción de imágenes sagitales por TACPM del SNC en un corte sagital.* (A) Randy y (B) María José, con ventriculomegalia moderada (flechas). (C) Imagen dorsal del cerebro adaptada de: Cozzi et al. 2016. La Línea roja corresponde al nivel de corte sagital utilizado.

Algunos estudios sugieren que el exceso de LCR en cetáceos con ventriculomegalia se debe a un drenaje insuficiente, como consecuencia al bloqueo

aracnoideo y el sistema venoso dural del seno sagital dorsal, esto puede suceder por la acumulación de restos celulares generados por el crecimiento bacteriano, explicando así que la hidrocefalia resultante y el aumento de la presión intracraneal, tengan un efecto fatal en la capacidad del animal para nadar y buscar alimento (Davson et al. 1970, Davison 2020), sin dejar de lado la inflamación asociada que rodea el sistema ventricular (González-Barrientos et al. 2010). El exceso de LCR en los animales con ventriculomegalia moderada es aún más evidente que la leve y permite observar con mayor claridad estructuras ventriculares como el tercer ventrículo y plexo coroideo.

3.1.1.4. Casos con ventriculomegalia severa

Se obtuvieron dos casos con ventriculomegalia severa de los casos de AKA Fernanda y Covid. En el caso de Fernanda se pudo identificar claramente un aumento de todos los ventrículos, incluyendo el cuarto ventrículo y sus aberturas laterales. En el caso de Covid se observó un aumento de los ventrículos y definidas áreas hipoatenuadas. En ambos casos se pudo identificar el acueducto cerebral (Figuras 13, 14 y 15).

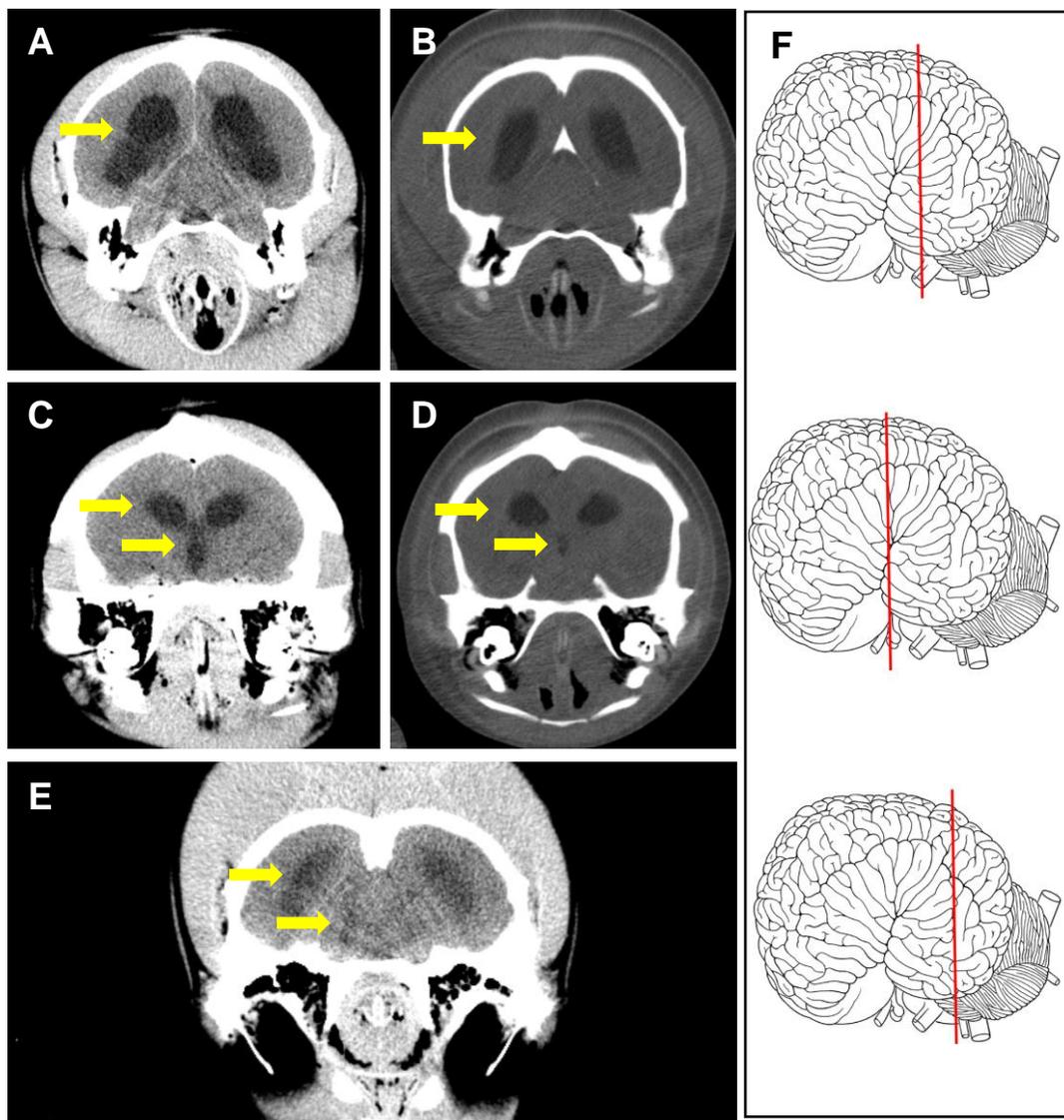


Figura 13. Reconstrucción de imágenes transversales de TACPM del SNC en un corte transversal. (A) Fernanda y (B) Covid, agrandamiento de ventrículos laterales y tercer ventrículo de (C) Fernanda y (D) Covid y agrandamiento del cuarto ventrículo de (E) Fernanda, ambos con ventriculomegalia severa (flechas). (F) imágenes laterales del cerebro adaptadas de: Cozzi et al. 2016. La Línea roja corresponde al nivel de corte transversal utilizado.

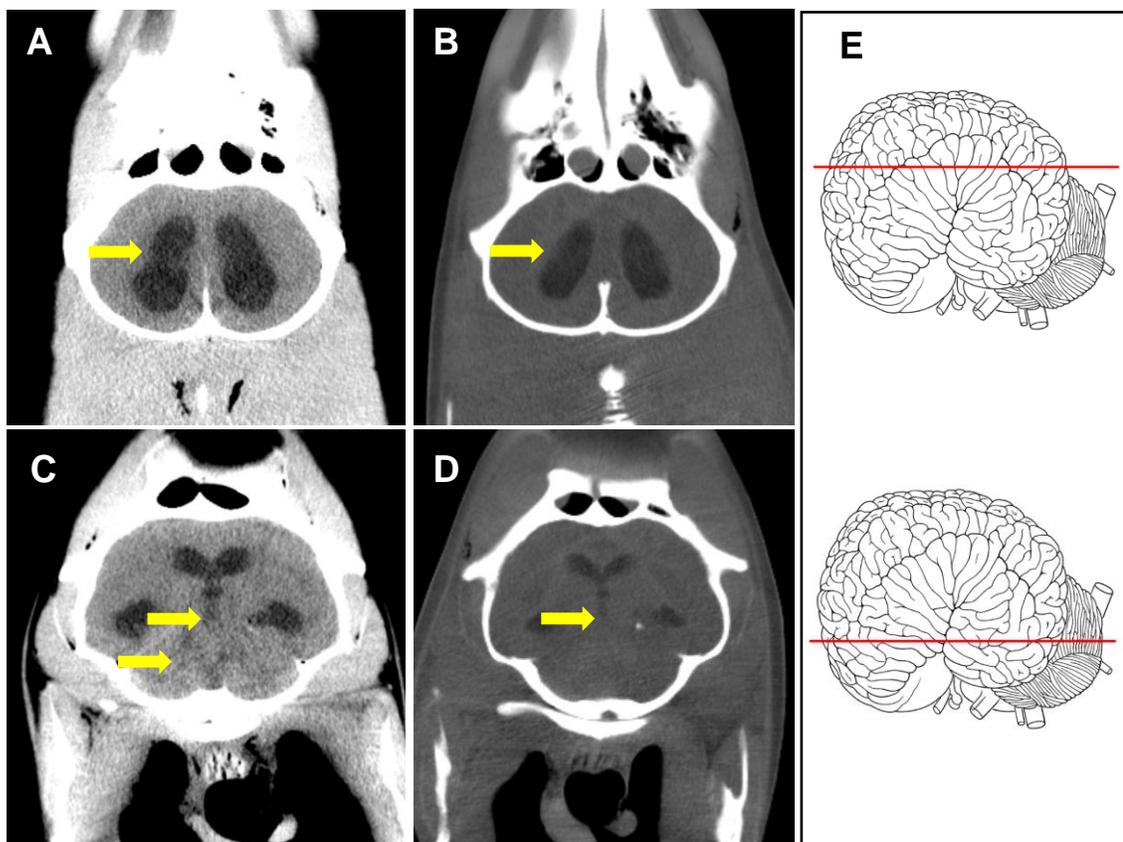


Figura 14. Reconstrucción de imágenes dorsales por TACPM del SNC en un corte dorsal. (A) Fernanda y (B) Covid con agrandamiento de los ventrículos laterales, (C) Fernanda y (D) Covid con agrandamiento del tercer ventrículo, además se observa el acueducto cerebral, en (C) Fernanda se aprecia también el acueducto cerebral y los bordes laterales del cuarto ventrículo con las aberturas laterales del cuarto ventrículo, ambos casos con ventriculomegalia severa (flechas). (E) Imágenes laterales del cerebro adaptadas de: Cozzi et al. 2016. La Línea roja corresponde al nivel de corte dorsal utilizado.

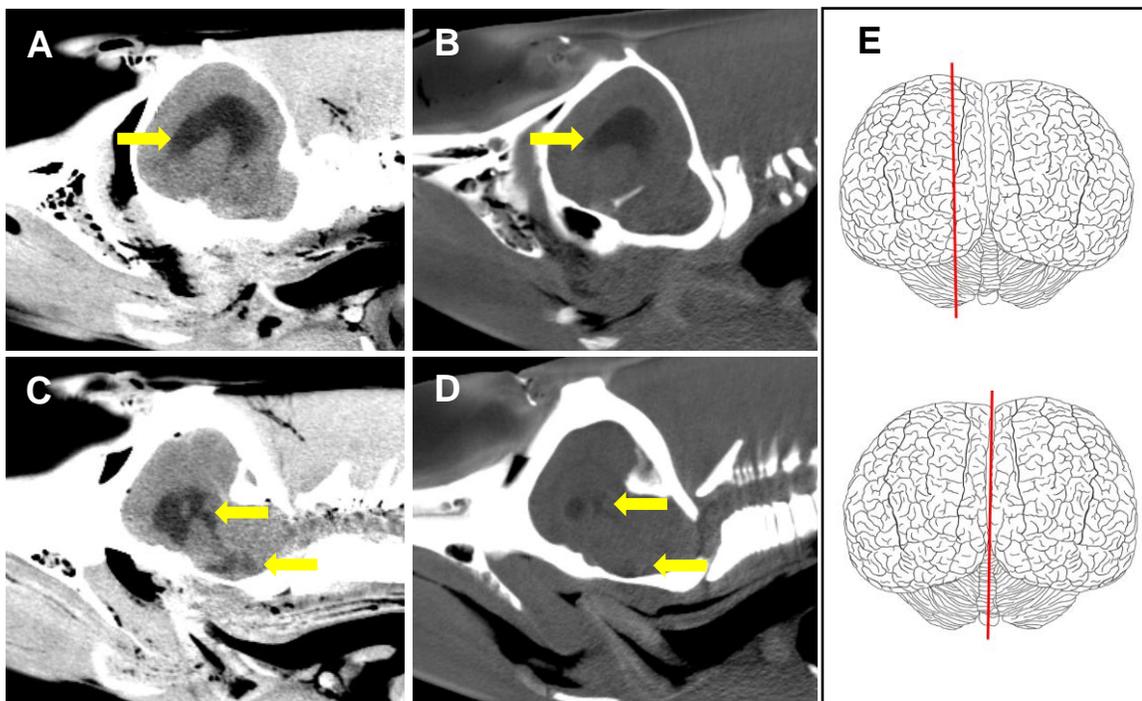


Figura 15. Reconstrucción de imágenes sagitales por TACPM del SNC en un corte sagital. (A) Fernanda y (B) Covid con agrandamiento de ventrículos laterales, (C) Fernanda y (D) Covid con agrandamiento del tercer ventrículo, el acueducto cerebral y el cuarto ventrículo, ambos casos con ventriculomegalia severa. (E) Imágenes dorsales del cerebro adaptada de: Cozzi et al. 2016.

Como parte de las alteraciones cerebrales causadas por la neurobrucelosis en cetáceos, se incluye la hidrocefalia con dilatación de los ventrículos laterales debido a la acumulación de LCR secundario a la inflamación que rodea el sistema ventricular (González-Barrientos et al. 2010); sin embargo, de forma usual en el diagnóstico *post mortem* de la neurobrucelosis en cetáceos encallados se describe con la presencia o no de hidrocefalia, sin incluir la determinación de la severidad de la ventriculomegalia sugestiva a hidrocefalia como si se puede hacer con la virtopsia.

La implementación del TACPM en estos animales encallados permitió la reconstrucción de imágenes transversales, dorsales y sagitales, determinándose que

la hipoatenuación del sistema ventricular indica diferentes niveles de severidad de ventriculomegalia. En cetáceos diagnosticados con brucelosis es un hallazgo sugestivo de hidrocefalia, por otro lado, en animales sin neurobrucelosis, como en los animales son alteraciones, el sistema ventricular no se puede visualizar mediante TACPM (Figuras 4, 5 y 6) (Robles-Malagamba et.al 2021, en prensa).

3.1.2. Índice de Evans

De los 12 cetáceos analizados en esta práctica dirigida, se obtuvo el resultado del índice de Evans en los siete animales que presentaron ventriculomegalia (Cuadro 3).

Cuadro 3. *Índice de Evans calculado en los siete animales que presentaron ventriculomegalia en diferentes grados de severidad.*

AKA	Índice de Evans
Julián	0.19
Hernán	0.20
Francisco	0.22
María José	0.28
Randy	0.29
Covid	0.31
Fernanda	0.32

El caso con el índice más bajo fue el de AKA Julián con un índice de Evans de 0.19 (Figura 16), este caso fue uno de los que presentaba ventriculomegalia leve y el índice más alto fue el de AKA Fernanda con un índice de Evans de 0.32 (Figura 17), este caso presentó ventriculomegalia severa.

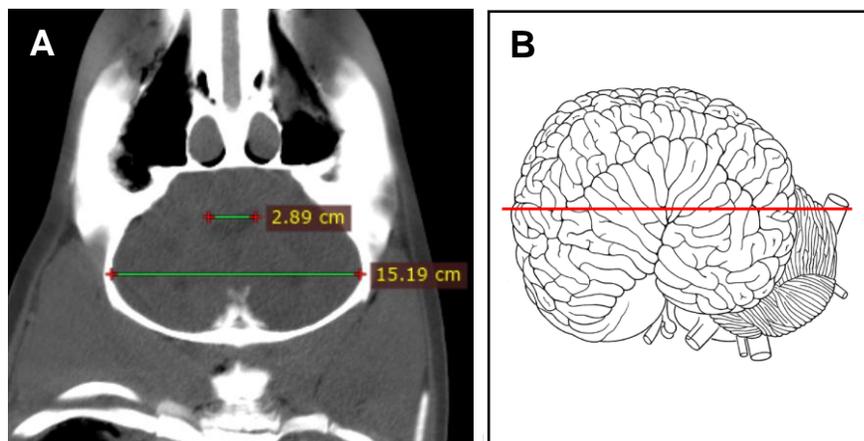


Figura 16. Reconstrucción de imágenes dorsales por TACPM del SNC para calcular el índice de Evans. (A) Julián con las medidas tomadas ($IE=0.19$), el cual alcanzó el valor más bajo. (B) Imagen lateral del cerebro adaptada de: Cozzi et al. 2016. La Línea roja corresponde al nivel de corte dorsal utilizado.

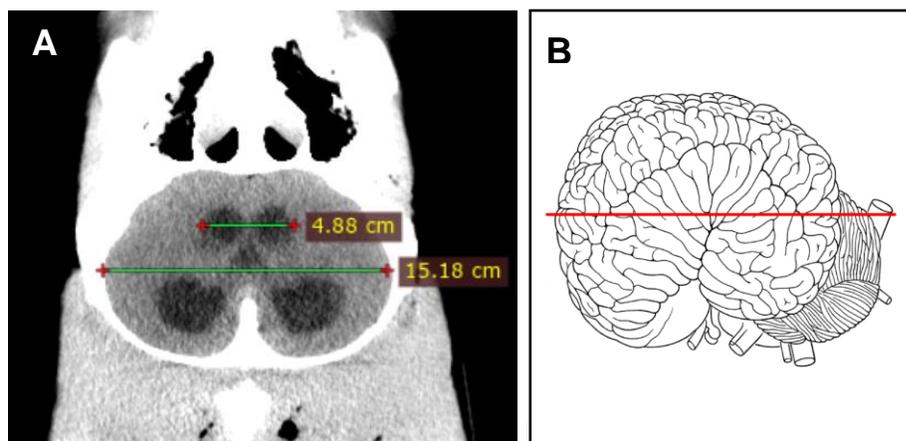


Figura 17. Reconstrucción de imágenes dorsales por TACPM del SNC para calcular el índice de Evans. (A) Fernanda con las medidas tomadas ($IE=0.32$), el cual alcanzó el valor más alto. (B) Imagen lateral la del cerebro adaptada de: Cozzi et al. 2016. La Línea roja corresponde al nivel de corte dorsal utilizado.

Actualmente no se han establecido parámetros de TAC para determinar la severidad de la ventriculomegalia en cetáceos afectados por neurobrucelosis, pero en medicina humana existen diferentes parámetros establecidos y aunque se determina

que la resonancia magnética (RM) es la principal modalidad para obtener imágenes detalladas para diagnosticar hidrocefalia (Bradley 2001), en particular, la literatura incluye las imágenes obtenidas por TAC como uno de los estudios de gran precisión para observar la hidrocefalia, puesto que las imágenes reflejan el tamaño dilatado de los ventrículos por el aumento en la cantidad de LCR (Zhang et al. 2019), tomando esto en cuenta, se procedió a elegir medidas prácticas y sencillas mediante el índice de Evans (IE) y el ángulo calloso (AC), para evaluar el agrandamiento de los ventrículos (Van Horn y McManus 1992).

El IE describe la relación entre el diámetro de los cuernos frontales (cuernos anteriores en cetáceos) de los ventrículos laterales y el diámetro más grande del cerebro de una imagen transversal en humanos (dorsal en cetáceos) (McAllister et al. 1998, Laubner et al. 2015), con el IE la ventriculomegalia es una condición obligatoria que se define con un valor de corte de diagnóstico superior a 0.3 como único criterio morfológico en las guías internacionales y japonesas de neurología humana (Ishikawa 2004, INPH Guideline Study Group 2005).

Basado en este punto de corte solamente los dos animales con ventriculomegalia severa se encuentran por encima del valor utilizado en medicina humana, evidenciándose la necesidad de ajuste de estos índices para los tres delfines con ventriculomegalia moderada (valores de 0.22, 0.28 0.29) y los dos delfines con ventriculomegalia leve (valores de 0.19 y 0.22).

El IE es un criterio cuantitativo que se ha utilizado ampliamente para evaluar la ventriculomegalia; sin embargo, para la determinación de valores específicos se deben

considerar estudios adicionales que incluyan otros factores como la edad, género y el índice de masa corporal de los individuos, así como se ha realizado en estudios previos en medicina humana (Gyldensted y Kosteljanetz 1976, Skullerud 1985, Toma et. al 2011).

3.1.3. Ángulo Calloso

El resultado del ángulo calloso se obtuvo en los siete delfines que presentaron ventriculomegalia (Cuadro 4). De los ángulos callosos evaluados en la región peribullar el más pequeño fue el de AKA Fernanda, este caso había presentado ventriculomegalia severa y tuvo el índice de Evans más alto, mientras que el ángulo calloso más grande lo obtuvo AKA Julián, quien tuvo ventriculomegalia leve y alcanzó el índice de Evans más bajo (Figura 18). Con los ángulos callosos medidos en la región mandibular se encontró también que el más pequeño fue el de AKA Fernanda y el más grande el de AKA Julián (Figura 19).

Cuadro 4. *Ángulos callosos estimados en los siete animales que presentaron ventriculomegalia en las regiones anatómicas peribullar y mandibular.*

AKA	Región Peribullar	Región Mandibular
Julián	95.5°	97.7°
Hernán	94.8°	95.5°
Francisco	92.7°	96°
María José	80.1°	93.9°
Randy	71.8°	73.8°
Covid	67.9°	82.4°
Fernanda	57.1°	72.8°

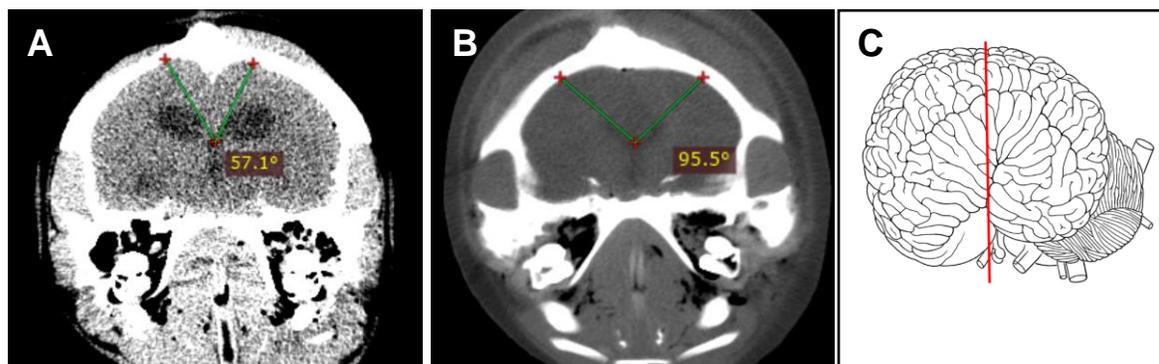


Figura 18. Reconstrucción de imágenes transversales por TACPM del SNC en la región peribullar. (A) Fernanda con el ángulo calloso más bajo ($AC=57.1$) y de (B) Julián con el ángulo calloso más alto ($AC=95.5$) del grupo evaluado. (C) Imagen lateral del cerebro adaptada de: Cozzi et al. 2016. La Línea roja corresponde al nivel de corte transversal utilizado.

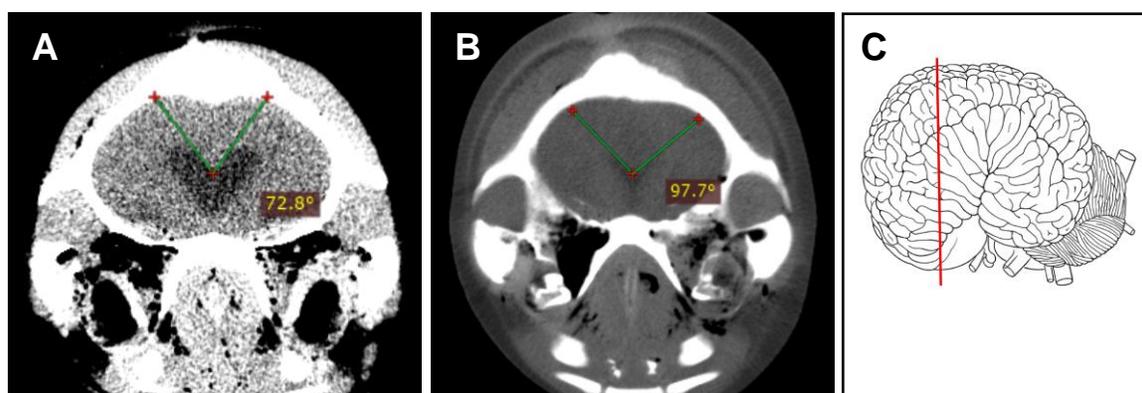


Figura 19. Reconstrucción de imágenes transversales por TACPM del SNC en la región mandibular. (A) Fernanda con el ángulo calloso más bajo ($AC=72.8$) y de (B) Julián con el ángulo calloso más alto ($AC=97.7$) del grupo evaluado. (C) Imagen lateral del cerebro adaptada de: Cozzi et al. 2016. La Línea roja corresponde al nivel de corte dorsal utilizado.

El AC describe el ángulo entre el cuerpo calloso como centro y las superficies internas dorsomediales de los ventrículos laterales en una imagen coronal en humanos

(transversal en cetáceos). En medicina veterinaria se ha determinado por analogía con pacientes humanos a nivel de la glándula pituitaria a través de RM (Laubner et al. 2015), en cetáceos la región mandibular sería la ubicación más similar, no obstante, como estas medidas aún no se han establecido en estos animales también se tomó el ángulo calloso en la región peribullar como comparación. En medicina humana, un valor normal puede oscilar entre 100-120° (Ishii et al. 2008), por lo tanto, todos los ángulos obtenidos en ambas regiones anatómicas (región peribullar y mandibular) se encontraron por debajo de este rango confirmando la ventriculomegalia determinada para los casos evaluados.

Los resultados del AC también muestran una tendencia en los ángulos obtenidos en la región peribullar, ya que los casos con ventriculomegalia leve fueron los que obtuvieron los valores más altos, entre 92.7° y 95.5°, los casos con ventriculomegalia moderada se encontraron valores medios, entre 71.8° y 80.1° y los casos severos fueron más bajos, entre 57.1° y 67.9°, evidenciando como la medida del ángulo es inversamente proporcional al aumento del tamaño ventricular en la región peribullar, así como se ha reportado en medicina humana donde el AC aumenta con forme el volumen ventricular disminuye en pacientes humanos (Virhammar et al. 2018). De manera diferente ocurrió en la región mandibular donde los AC no presentaron ninguna asociación según la severidad establecida, no obstante, es necesario realizar estudios futuros tanto para el IE como el AC, y así determinar esta distinción de valores de forma más específica para los cetáceos.

Asimismo, es importante tomar en cuenta todos los cetáceos encallados presentaron síntomas nerviosos, por lo que la presentación clínica no parece estar

asociada con la severidad de la ventriculomegalia en la neurobrucelosis, además, sin importar este hallazgo, la mayoría murieron pocas horas posterior al encallamiento, teniendo un impacto importante en el pronóstico de supervivencia de estos animales en las playas.

3.1.4. Hallazgos del sistema osteoarticular

Dos animales que presentaron ventriculomegalia leve también mostraron alteraciones a nivel vertebral. En el caso de AKA Julián se observó un estrechamiento del espacio del disco intervertebral caudal entre Ca3-Ca4, con hiperatenuación y osteólisis de las placas terminales vertebrales (Figura 20 y 21).

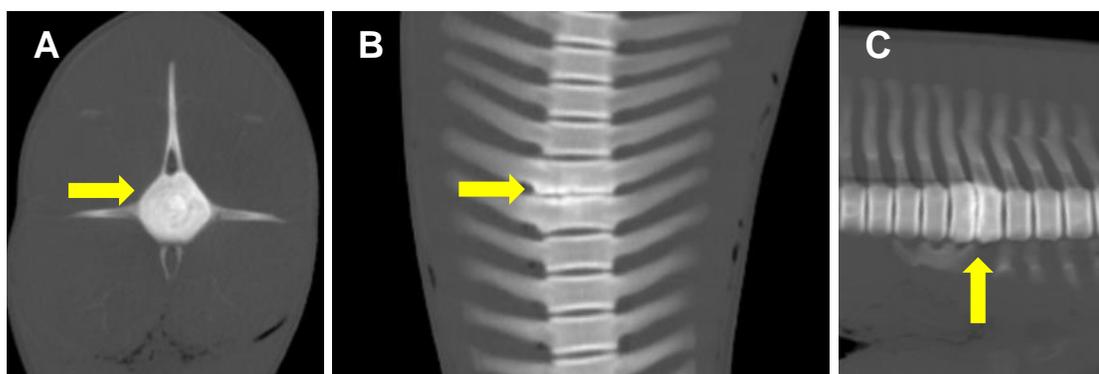


Figura 20. *Reconstrucción de imágenes del caso de Julián por TACPM en función 3D MPR en la región vertebral caudal. Vista transversal (A), dorsal (B) y sagital (C) con hiperatenuación del cuerpo vertebral y estrechamiento del espacio del disco intervertebral entre Ca3-Ca4.*

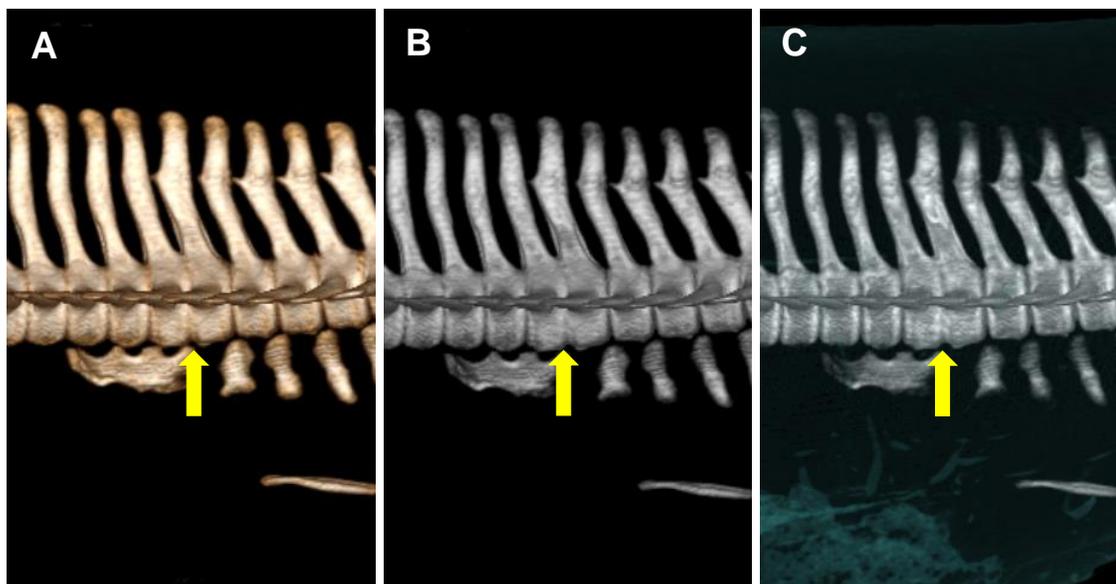


Figura 21. *Reconstrucción de imágenes del caso de Julián por TACPM en función 3D VR en la región vertebral caudal. Vista lateral en diferentes presentaciones (A) en 3D Hueso, (B) 3D Hueso blanco y negro y (C) 3D Hueso y Piel con fusión del espacio del disco intervertebral entre Ca3-Ca4 (flechas).*

En el caso de AKA Francisco se observó con osteólisis a nivel superior del cóndilo occipital izquierdo (Figura 22 y 23).

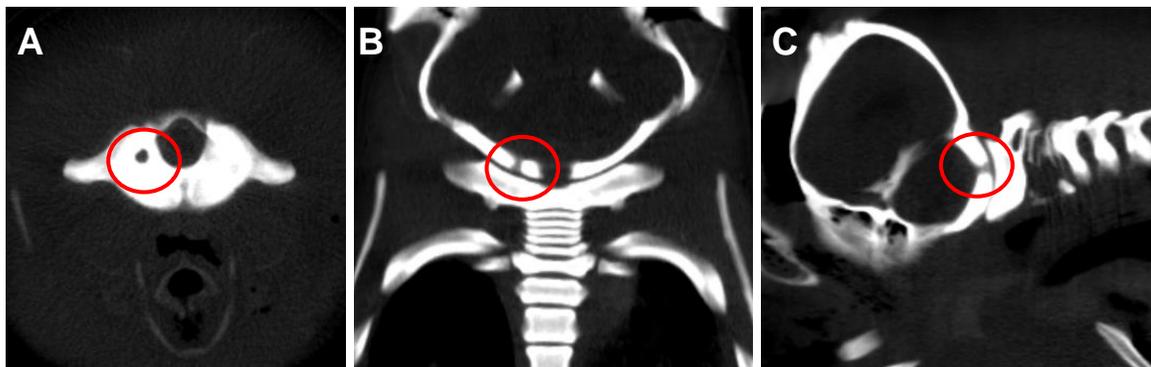


Figura 22. Reconstrucción de imágenes del caso de Francisco en función 3D MPR del cóndilo occipital. Vista (A) transversal, (B) dorsal y (C) sagital, con osteólisis (círculos) del cóndilo occipital izquierdo.

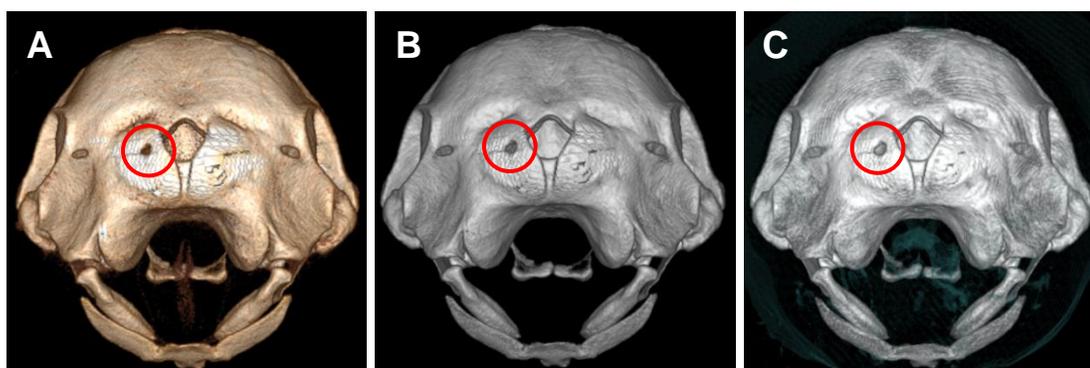


Figura 23. Reconstrucción de imágenes de Francisco por TACPM en función 3D VR en la región occipital del cráneo de la vista caudal. En diferentes presentaciones (A) 3D de Hueso, (B) 3D Hueso blanco y negro y (C) 3D Hueso y Piel con osteólisis (círculos) a nivel superior del cóndilo occipital izquierdo.

La reconstrucción de imágenes de TACPM también permitieron identificar dos lesiones del SOA relacionadas con la infección por *Brucella ceti*, estos hallazgos pueden resultar difíciles de detectar durante la rutina de necropsia debido a la

ubicación anatómica de estas lesiones. El estrechamiento del espacio del disco intervertebral entre las vértebras caudales relacionado con la osteoartritis vertebral, así como la osteomielitis en el cóndilo occipital, pueden considerarse hallazgos patológicos incidentales, pero se han realizado varios reportes de *B. ceti* aislado de diferentes lesiones en los huesos y articulaciones de cetáceos (Guzmán-Verri et al. 2012).

3.2. Necropsias

Durante el periodo 2017-marzo 2021 se realizaron 21 necropsias, entre ellas se identificaron siete especies diferentes de cetáceos (Cuadro 1 y 4). Todos los animales estudiados se encontraban en código de preservación 2 (fresco).

De todas las necropsias realizadas se encontró una proporción similar de género con 12 machos (57%), diez eran adultos, un juvenil y una cría, y las demás fueron nueve hembras (43%), seis adultas y tres crías, dos de estas encallaron con su respectiva madre. La especie más común fue *S. coeruleoalba*, con un total de 14 necropsias.

La afección por neurobrucelosis según el género también resultó similar ya que se presentaron positivos ocho machos (57%) y seis hembras (43%). La mayor cantidad de cetáceos con neurobrucelosis fueron 11 adultos (79%), seguido por dos crías (14%) y un juvenil (7%), es necesario considerar que la epidemiología y presentación de esta enfermedad en animales encallados merece mayor investigación ya que no se ha visto a nivel mundial una tendencia clara según el género o edad en odontocetos infectados con *Brucella* spp. marina (Hernández-Mora et al. 2009, Davison 2020).

3.2.1. Hallazgos del sistema nervioso central

Durante la necropsia se identificaron siete animales con los ventrículos laterales dilatados, los mismos que resultaron con diferentes grados de ventriculomegalia en el TACPM (Figura 24 y 25).

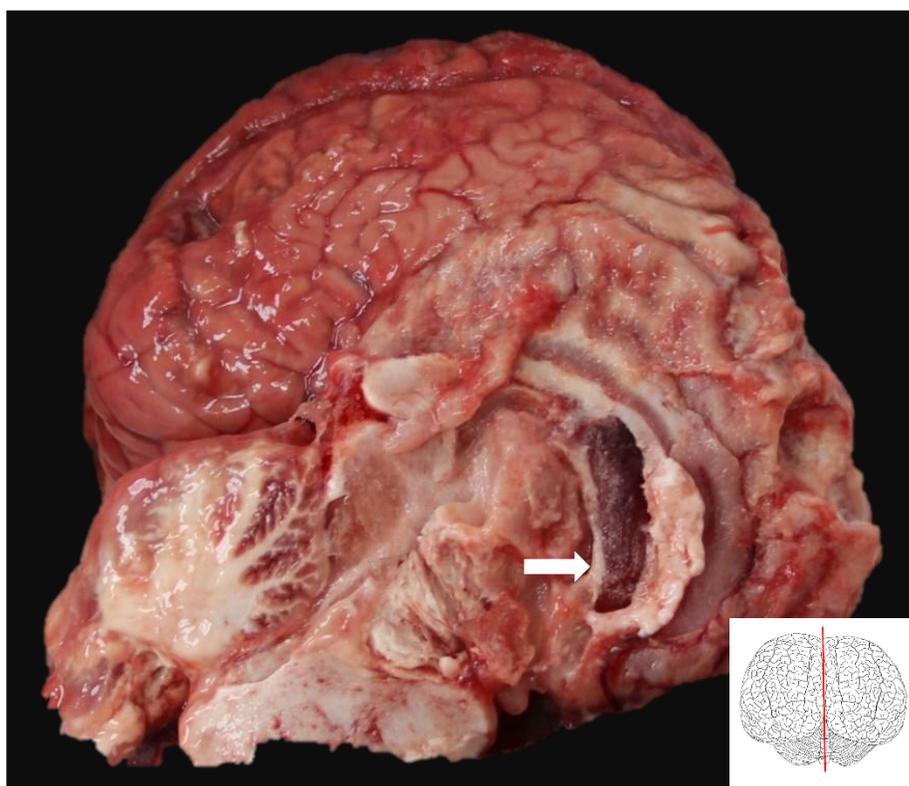


Figura 24. *Vista medial del cerebro, corte sagital con ventriculomegalia.* Cuerpo anterior del ventrículo lateral izquierdo dilatado (flecha) del caso de María José, caso identificado con ventriculomegalia moderada en la virtopsia. El inserto muestra la imagen drosal del cerebro adaptada de: Cozzi et al. 2016. La Línea roja corresponde al nivel de corte sagital utilizado.

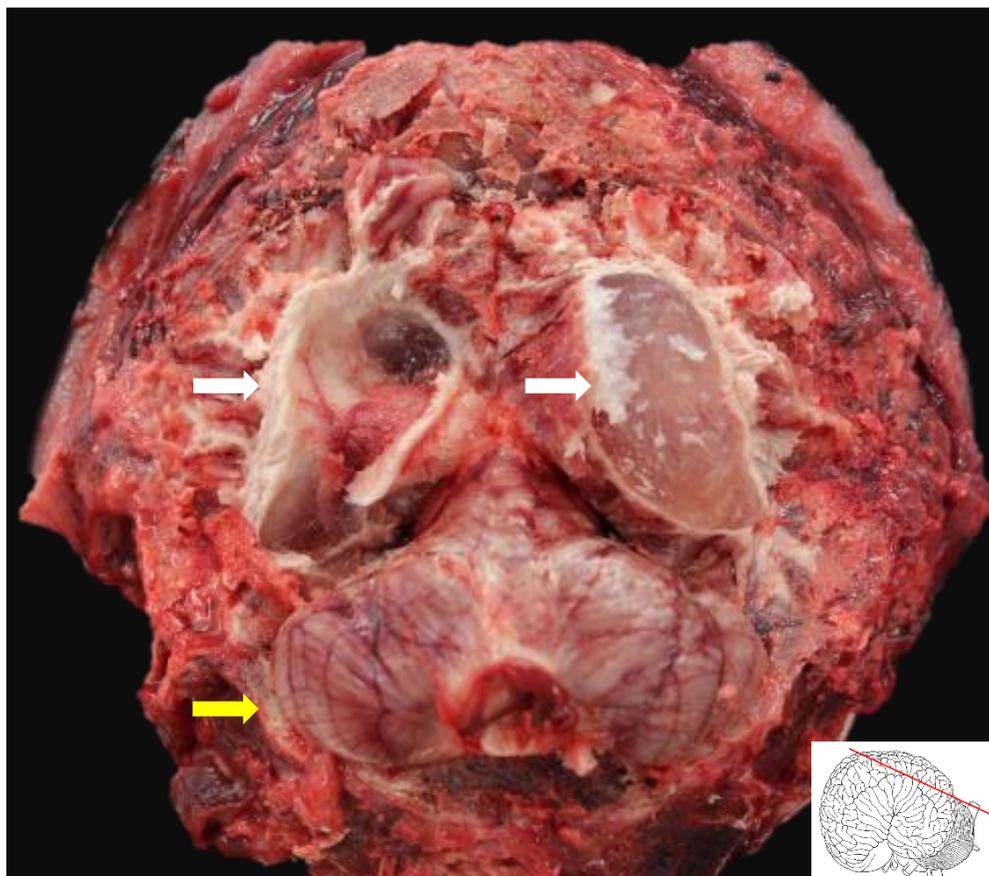


Figura 25. *Vista posterior del cerebro, corte oblicuo con ventriculomegalia.* Ventriculos laterales dilatados (flechas blancas) y cráneo (flecha amarilla) del caso de Covid, el ventrículo derecho se observa con LCR congelado, caso identificado con ventriculomegalia severa en la virtopsia. El inserto muestra la imagen lateral del cerebro adaptada de: Cozzi et al. 2016. La Línea roja corresponde al nivel de corte oblicuo utilizado.

A nivel macro es posible confirmar la ventriculomegalia observada en la virtopsia, sin embargo, debido a la pérdida de LCR que se puede generar por manipulación a la hora de hacer los cortes es difícil determinar la severidad como si se puede hacer con las imágenes por TACPM, no obstante, gracias a las imágenes previamente obtenidas se puede realizar un manejo cuidadoso para la evitar perder cantidades mediante la

congelación adecuada para extraer la mayor cantidad de muestra para los cultivos bacteriológicos.

3.2.2. Hallazgos del sistema osteoarticular

En el caso de AKA Francisco se observó una lesión en la superficie articular del cóndilo occipital izquierdo, focal, de coloración rojo oscuro, redonda con bordes irregulares, con leve depresión, de 1.0 cm de diámetro y suave, identificada como un proceso focal de osteomielitis y osteólisis (Figura 26).

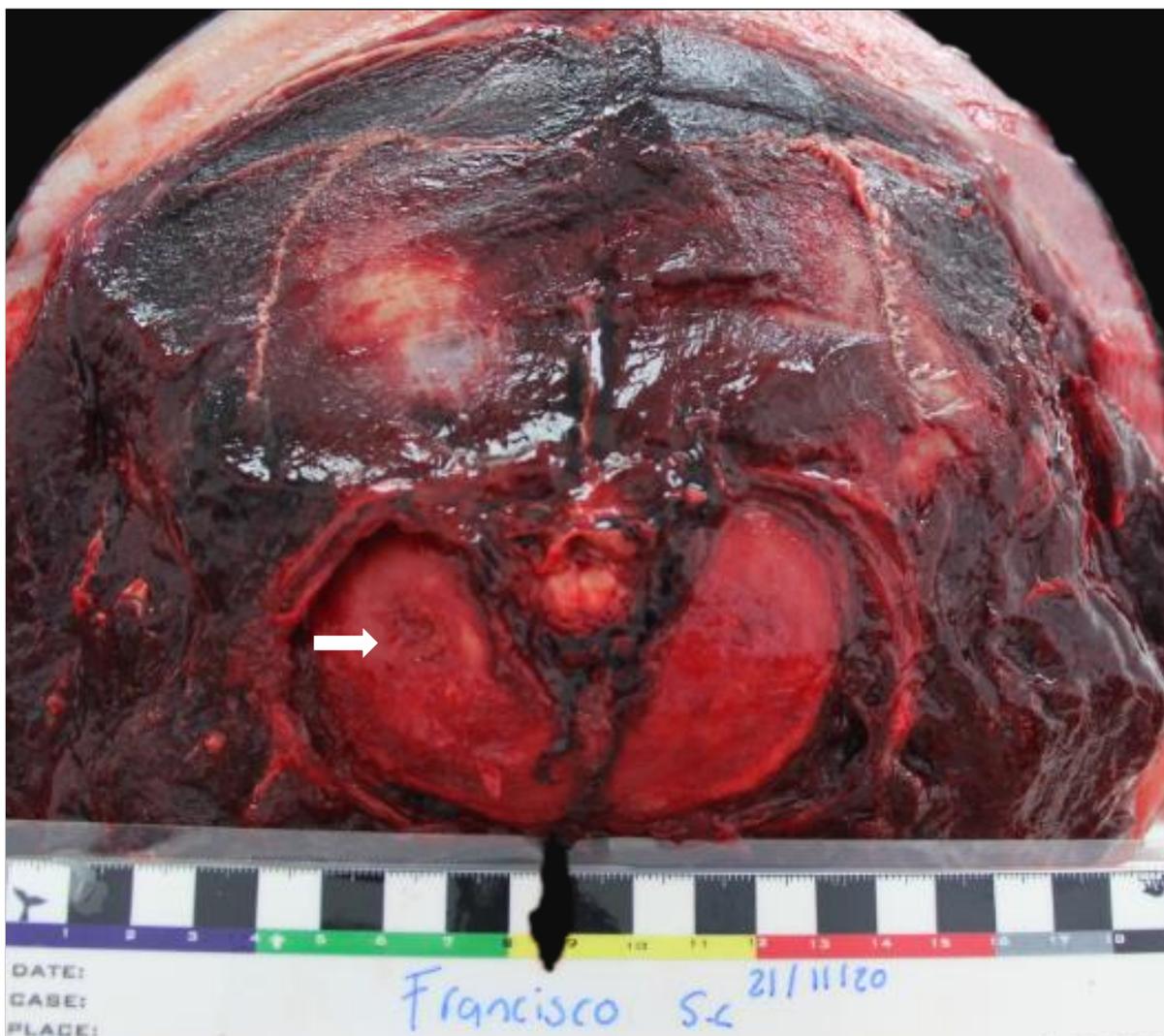


Figura 26. Vista caudal del cóndilo occipital izquierdo con osteomielitis y osteólisis (flecha) del caso de Francisco.

Se han reportado lesiones macro graves a nivel de la articulación atlantooccipital sugestivos a osteomielitis en un *L. acutus*, de donde se aisló *Brucella* spp. (Dagleish et al. 2007), así como también se han identificado otras lesiones en animales con brucelosis con discoespondilitis espinal (Foster et al. 2002) y osteoartritis escapulohumeral (González-Barrientos et al. 2010), lo que confirma la susceptibilidad de los delfines rayados del PTO a complicaciones del sistema osteoarticular por la infección crónica con *Brucella ceti*

3.3. Bacteriología del SNC

Se realizaron estudios bacteriológicos de LCR y distintas partes del SNC a 21 cetáceos de las siete diferentes especies. Catorce animales resultaron positivos en cultivo a *Brucella* spp. del cerebro y LCR en tres especies diferentes, todos se caracterizaron como *Brucella* spp (Figura 27). Estas cepas se tipificaron 11 como *B. ceti* ST26, dos como ST27 y una se encuentra en proceso correspondiente al caso AKA Francisco. Los aislamientos confirmados como ST26 se recuperaron de diez *S. coeruleoalba* y un *D. delphis*, mientras que los aislamientos de ST27 correspondieron a dos *K. sima*. No se encontraron aislamientos de *B. ceti* en un *S. longirostris*, un *G. griseus*, tres *S. coeruleoalba*, un *T. truncatus* y un *L. hosei* (Cuadro 5), este último caso fue el único negativo que presentó ventriculomegalia leve en la virtopsia. Además, en el caso de AKA Francisco se logró aislar *Brucella* spp. por cultivo de la osteomielitis y osteólisis encontrada durante la necropsia en el cóndilo occipital.

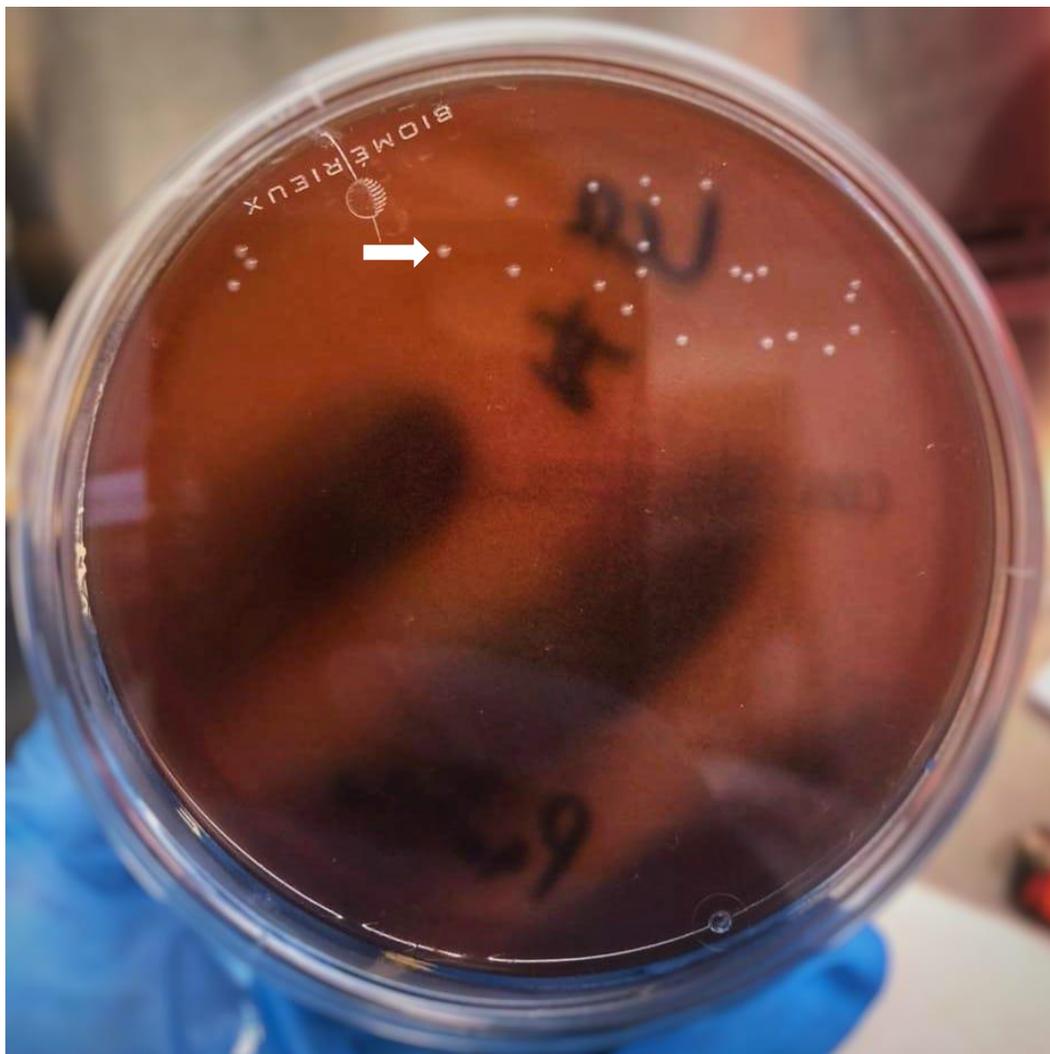


Figura 27. Cultivo bacteriológico con UFC (flecha) de *Brucella* spp. en agar sangre luego de 6 días de crecimiento.

Cuadro 5. Cultivos y caracterización bacteriológica de cetáceos para *Brucella* spp. del SNC 2017-marzo 2021.

AKA	Especie	Cultivos <i>Brucella</i> spp.	Caracterización
Eduardito	<i>D. delphis</i>	Positivo	ST26
OC	<i>S. coeruleoalba</i>	Positivo	ST26
Chiibal Kiin	<i>S. coeruleoalba</i>	Positivo	ST26
Irmo	<i>S. coeruleoalba</i>	Positivo	ST26
Vico	<i>S. coeruleoalba</i>	Negativo	NA
Fernanda	<i>S. coeruleoalba</i>	Positivo	ST26
Julián	<i>S. coeruleoalba</i>	Positivo	ST26
Kathy	<i>K. sima</i>	Positivo	ST27
Herradura	<i>K. sima</i>	Positivo	ST27
Hellen	<i>S. coeruleoalba</i>	Positivo	ST26
Raúl	<i>S. coeruleoalba</i>	Positivo	ST26
Aníbal	<i>G. griseus</i>	Negativo	NA
Randy	<i>S. coeruleoalba</i>	Positivo	ST26
María José	<i>S. coeruleoalba</i>	Positivo	ST26
Yen	<i>S. coeruleoalba</i>	Negativo	NA
Ana	<i>S. coeruleoalba</i>	Negativo	NA
María	<i>S. coeruleoalba</i>	Negativo	NA
Covid	<i>S. coeruleoalba</i>	Positivo	ST26
Hernán	<i>L. hosei</i>	Negativo	NA
Francisco	<i>S. coeruleoalba</i>	Positivo	NC
Tammy	<i>T. truncatus</i>	Negativo	NA

NA, no aplica; NC, no caracterizada.

Se ha aislado *B. ceti* del cerebro y LCR de diferentes especies de cetáceos encallados entre las más comunes se han encontrado en marsopas comunes (*Phocoena phocoena*), delfines de costados blancos (*Lagenorhynchus albirostris*), delfín de hocico blanco (*Lagenorhynchus acutus*), delfín nariz de botella (*T. truncatus*), delfín común (*D. delphis*) ballenas piloto de aleta larga (*Globicephala melas*) y, más recientemente, en ballenas picudas de Sowerby (*Mesoplodon bidens*) (Davison et al. 2021b). Sin embargo, esta patología ha sido mayormente descrita en delfines rayados (*S. coeruleoalba*) (Foster et al. 2002, Muñoz et al. 2006, Hernández-Mora et al. 2008, González-Barrientos et al. 2010, Jauniaux et al. 2010, Davison 2020).

La especie con mayor número de casos positivos (n=11) a *Brucella ceti* sigue siendo *S. coeruleoalba*, este hallazgo reafirma nuevamente la alta susceptibilidad de esta especie a desarrollar neurobrucellosis descrita para animales encallados en Costa Rica tal y como se viene describiendo desde el año 2008 (Hernández-Mora et al. 2008).

Por otro lado, durante el desarrollo de esta práctica dirigida también se reportó el aislamiento de *Brucella ceti* ST26 en un individuo de *D. delphis*. Esta especie de delfín frecuentemente resulta positiva para *Brucella* spp. en Europa, sin embargo, la neurobrucellosis se ha diagnosticado solo en tres casos juveniles en una presentación similar a los delfines *S. coeruleoalba*, esto resulta ser particular debido a que las dos especies comparten aspectos ecológicos y de comportamiento similares, ambas especies han sido reportadas nadando en grupos mixtos y se alimentan de peces y calamares similares (Frantzis y Herzing 2002, Bearzi et al. 2011, Jefferson et al. 2015, Davison 2020, Ross et al. 1994, Sierra et al. 2020), por lo que se agrega una especie más afectada por esta enfermedad en el Pacífico Tropical Oriental (PTO).

A nivel mundial la especie cachalote enano (*K. sima*) es considerada evasiva y poco estudiada a nivel biológico y veterinario, así como también se cuenta con información limitada con respecto a su distribución. Lo poco que se conoce se ha descrito de animales encallados, en algunos casos madre y cría (Manire et al, 2004).

Hasta la fecha los dos casos descritos en esta investigación representan la primera confirmación en el mundo de la susceptibilidad para la infección por *Brucella* spp. ST27 para esta especie de cetáceo, ampliando el número de especies que pueden resultar infectado, así como también la distribución mundial (Suárez-Esquivel et al. 2019, Hernández-Mora et al. 2021). La presencia de esta cepa ST27 solo se había detectado en *T. truncatus* en la costa Atlántica (Wu et al. 2014) y Pacífica (Ewalt et al. 1994) de Estados Unidos, posteriormente al norte del Mar Adriático en Croacia (Cvetnić et al. 2016, Duvnjak et al. 2017) y más recientemente en el pacífico occidental de japon (Ueno et al. 2020) y en Australia (Mackie et al. 2020).

El aislamiento logrado de *B. ceti* de la lesión del cóndilo occipital causando osteomielitis y osteólisis bacteriana en un delfín rayado (*S. coeruleoalba*) es similar al reportado y señalado anteriormente por Dagleish y colaboradores (2007).

3.4. Histopatología del sistema nervioso central

El perfil de las lesiones histopatológicas de los catorce animales que resultaron positivos a *Brucella* spp., evidenció meningoencefalitis predominantemente con infiltrado linfocítico perivascular y en meninges, también se lograron ver en menor proporción histiocitos y células plasmáticas, cada caso alcanzó diferentes grados de severidad según la ubicación del SNC.

3.4.1. Grado 1

Poca cantidad de linfocitos (pequeñas células con núcleos pequeños, teñidas de azul y citoplasma escaso) que se infiltran en el tejido de cerebro y meninges, señalados con la flecha negra (Figura 28 y 29).

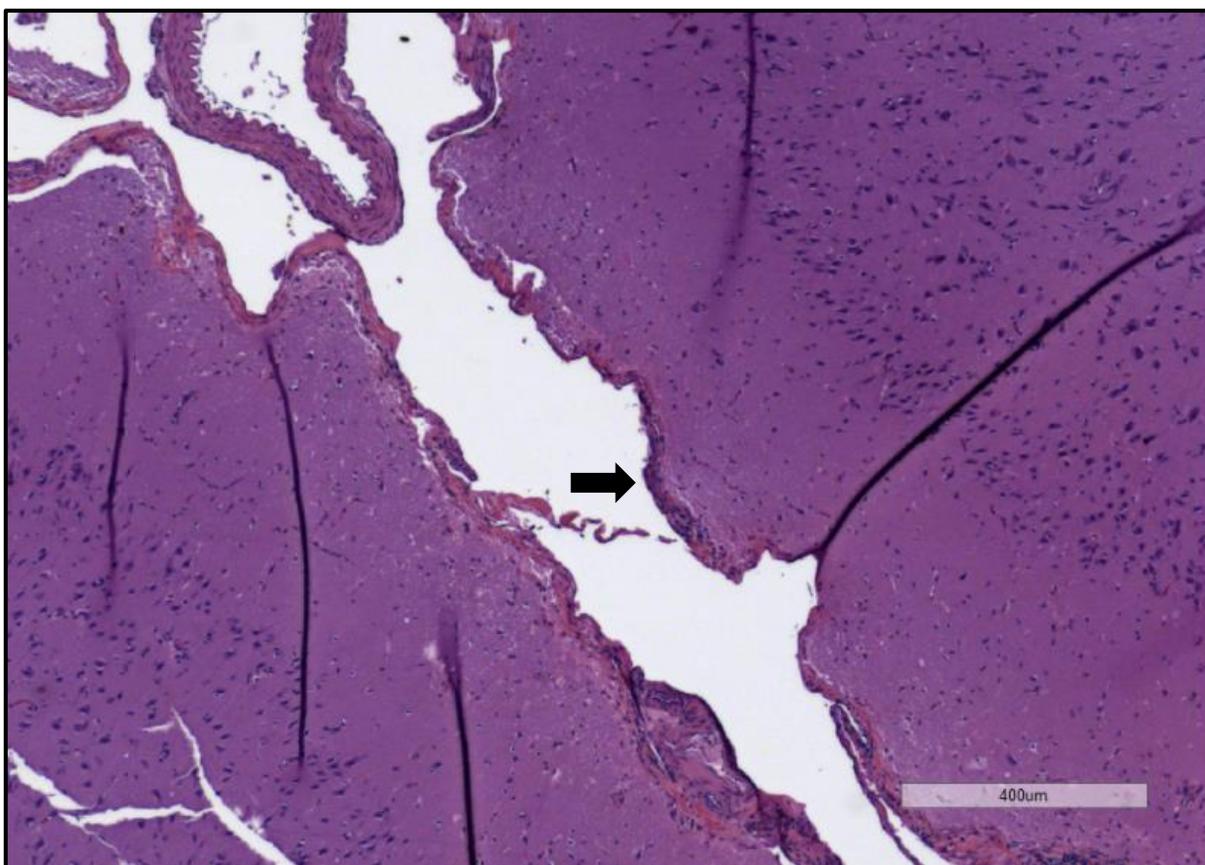


Figura 28. Corte histológico de cerebro y meninges de María José. Tinción hematoxilina-eosina. Barra=400 μ m, 5x.

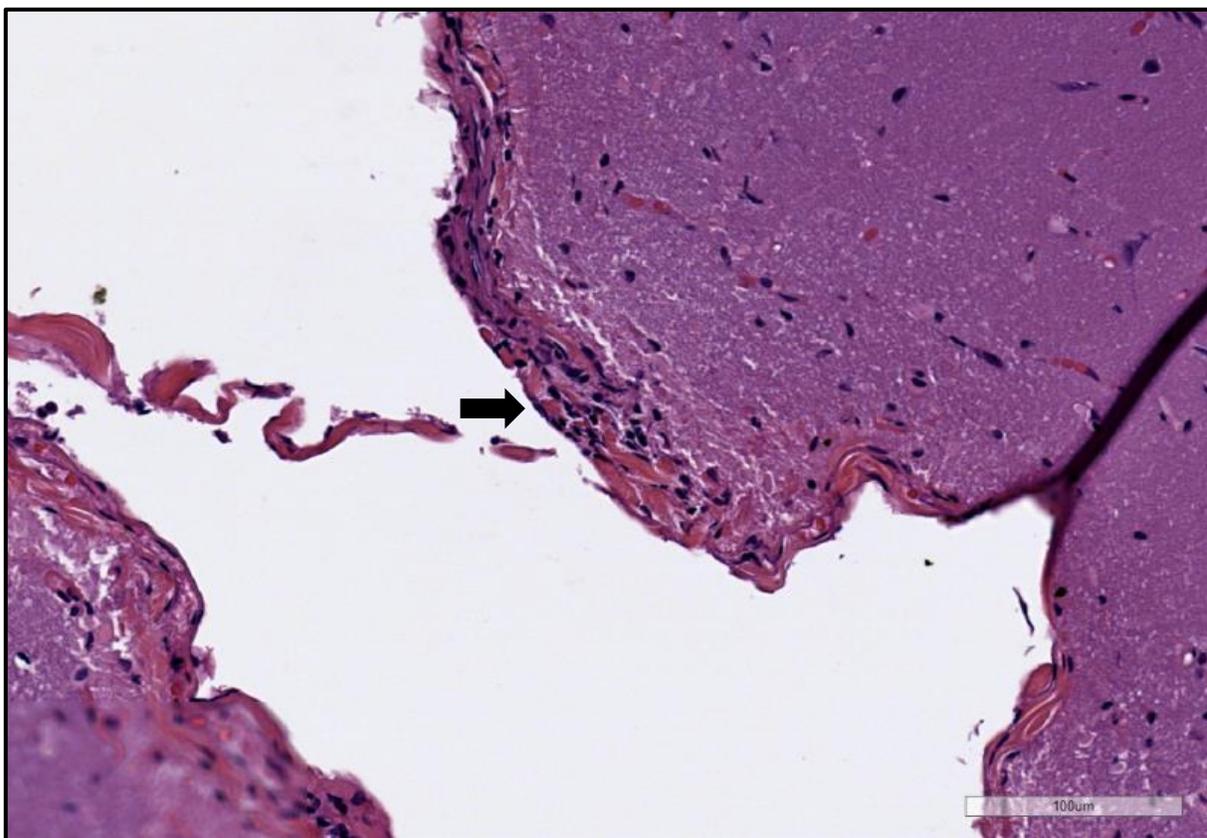


Figura 29. Corte histológico de cerebro y meninges de María José. Tinción hematoxilina-eosina. Barra=100 μ m, 20x.

3.4.2. Grado 2

Moderada cantidad de linfocitos que se infiltran en el tejido de cerebro y meninges, expandiendo las meninges que se observan más gruesas, señalados con la flecha negra (figuras 30 y 31).

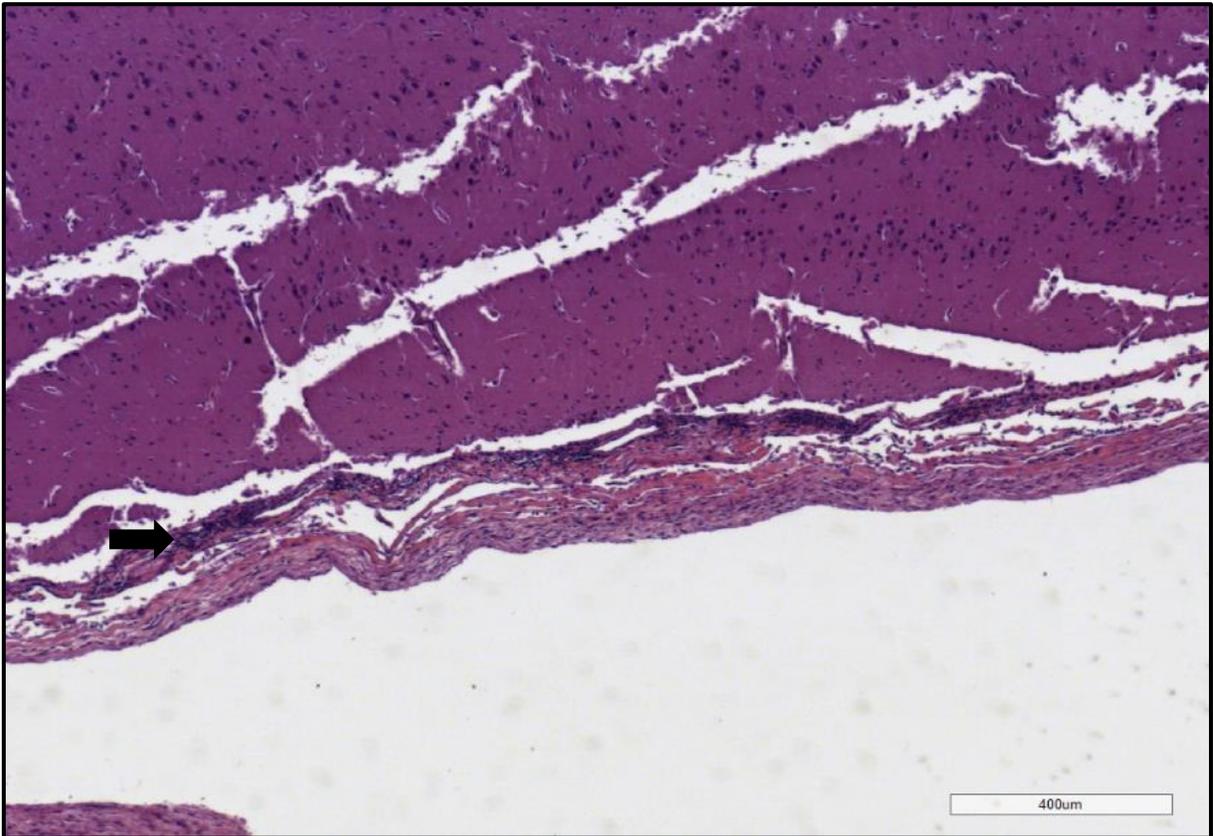


Figura 30. Corte histológico de cerebro y meninges de Chiibal Kiin. Tinción hematoxilina-eosina. Barra=400 μ m, 5x.

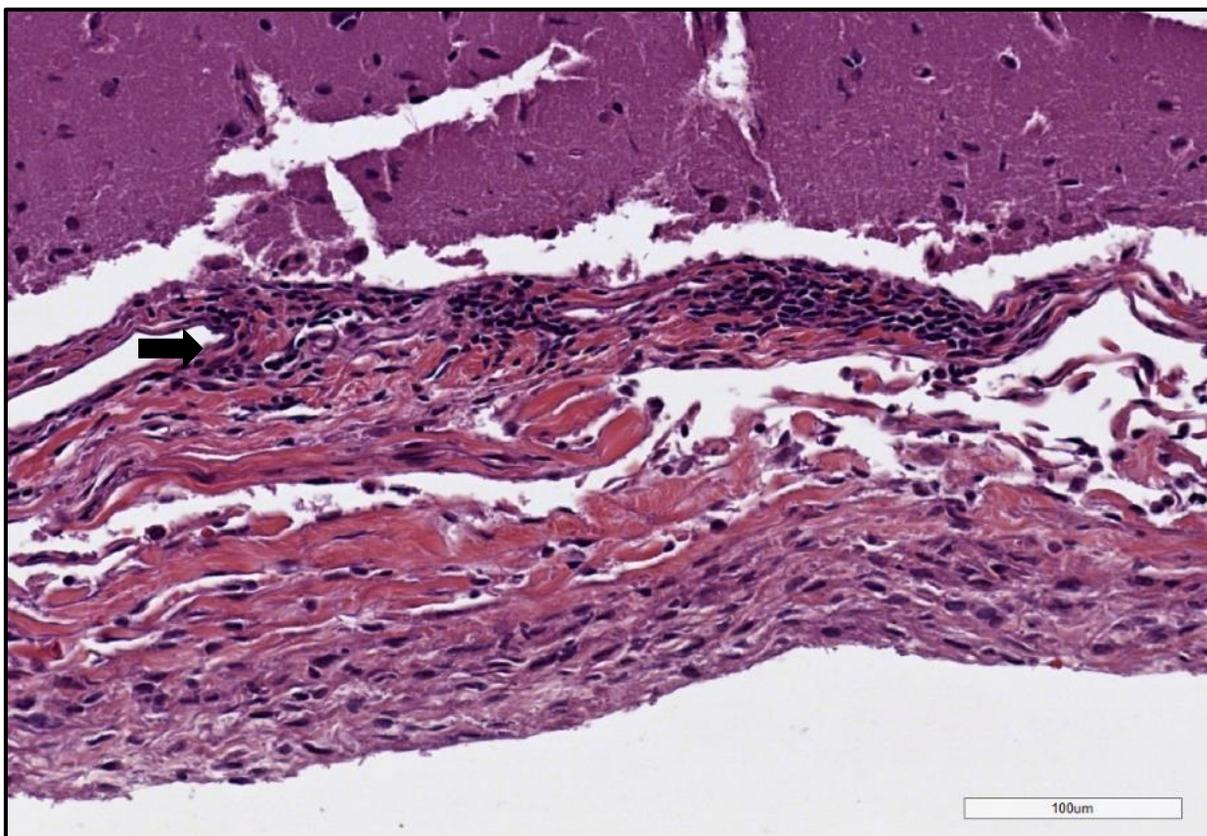


Figura 31. Corte histológico de cerebro y meninges de Chiibal Kiin. Tinción hematoxilina-eosina. Barra=100 μ m, 20x.

3.4.3. Grado 3

Hay un elevado número de linfocitos que se infiltran en el tejido de la corteza occipital, con distorsión grave de la anatomía normal que incluye una distensión y engrosamiento grave de las meninges, señalados con la flecha negra (Figura 32 y 33).

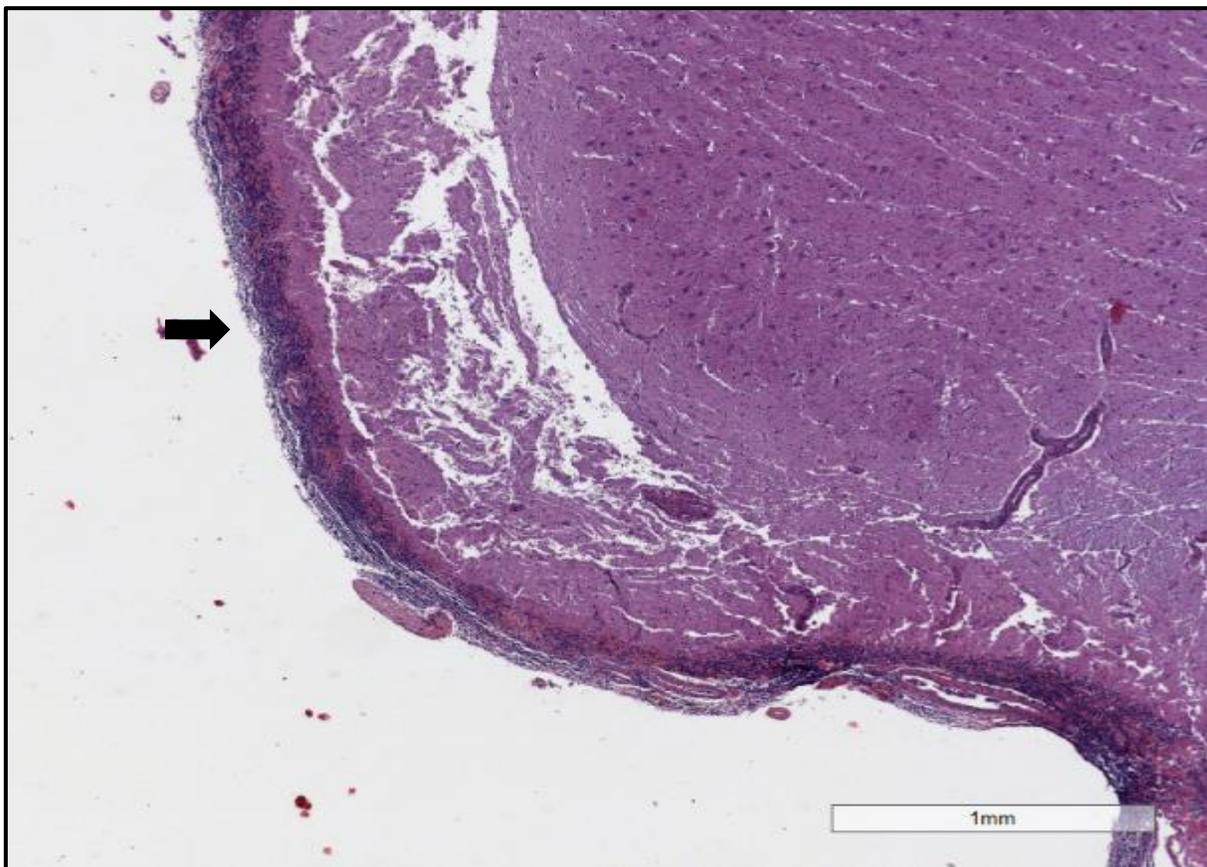


Figura 32. Corte histológico de cerebro de Chiibal Kiin. Tinción hematoxilina-eosina. Barra=1000 μ m, 2x.

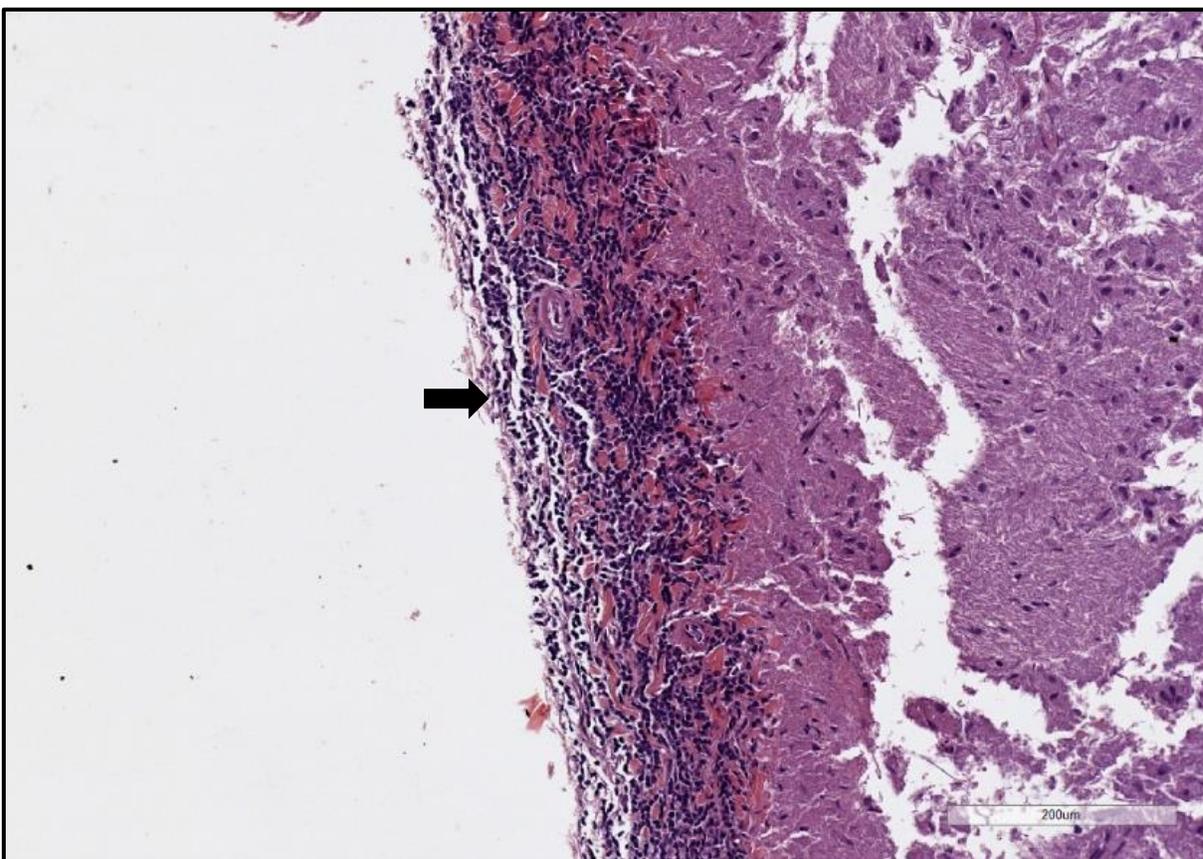


Figura 33. Corte histológico de corteza occipital de *Chiibal Kiin*. Tinción hematoxilina-eosina. Barra=200 μ m, 6x.

Todos los casos positivos a *B. ceti* ST 26 tienen lesiones con mayor severidad en los tejidos con meninges, con una tendencia de grados de severidad 3 y 2 en áreas caudales y ventrales del tronco encefálico, mesencéfalo (médula espinal, médula oblongada, puente, colículos) y cerebelo, que disminuye a grados de severidad 2 y 1 en las áreas craneales y dorsales (corteza cerebral parietal y frontal) y grados de severidad 1 en tejidos parenquimatosos (tálamo y núcleos basales) (Figuras 34, 35, 37 y 38).

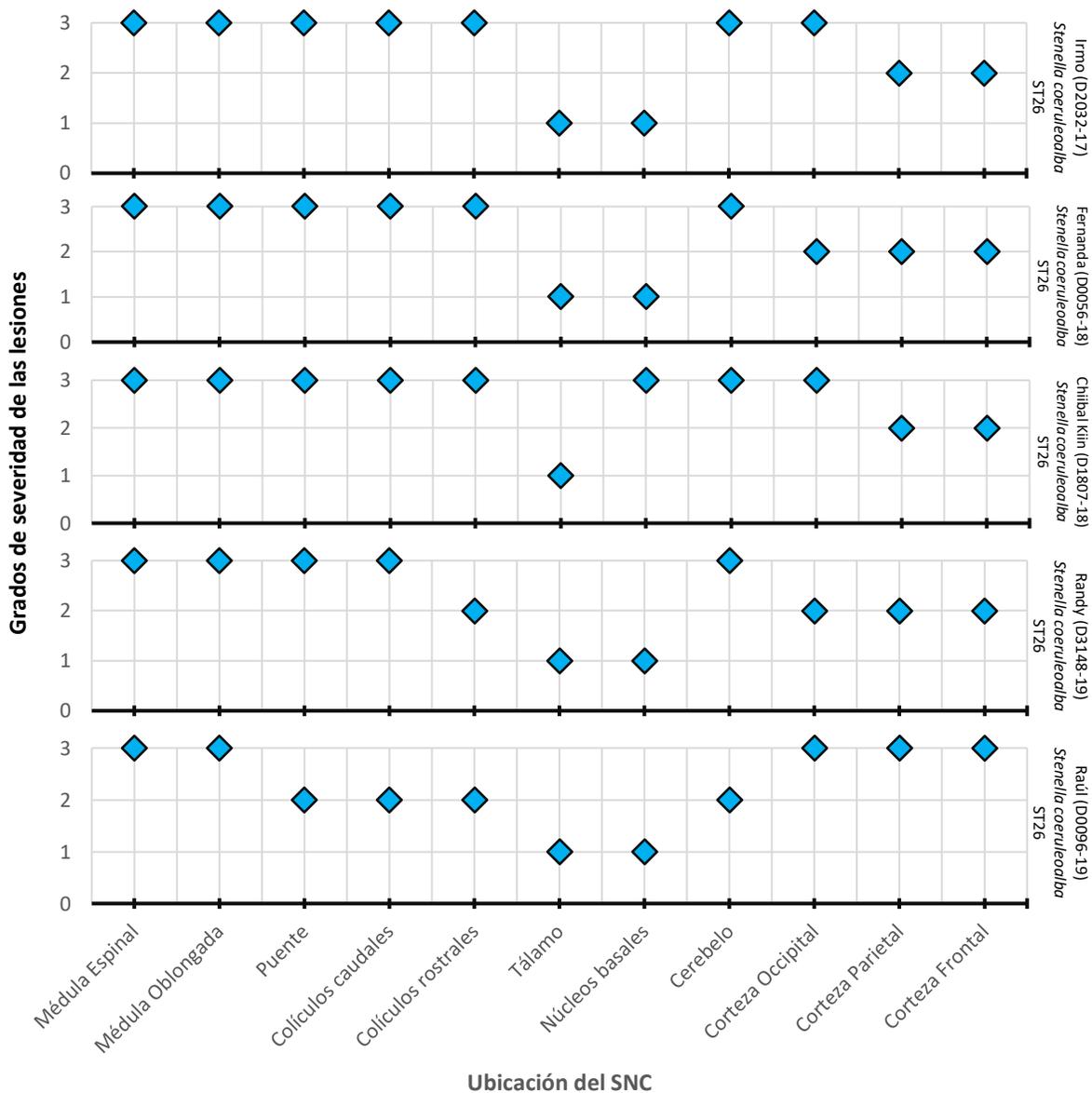


Figura 34. Perfiles totales de las lesiones con diferentes grados de severidad. Casos de Irmo, Fernanda, Chiibal Kiin, Randy y Raúl. Casos positivos a los cultivos y caracterización de *Brucella ceti* ST26. Se les asignaron grados de severidad entre 1 y 3 en las diferentes ubicaciones del SNC.

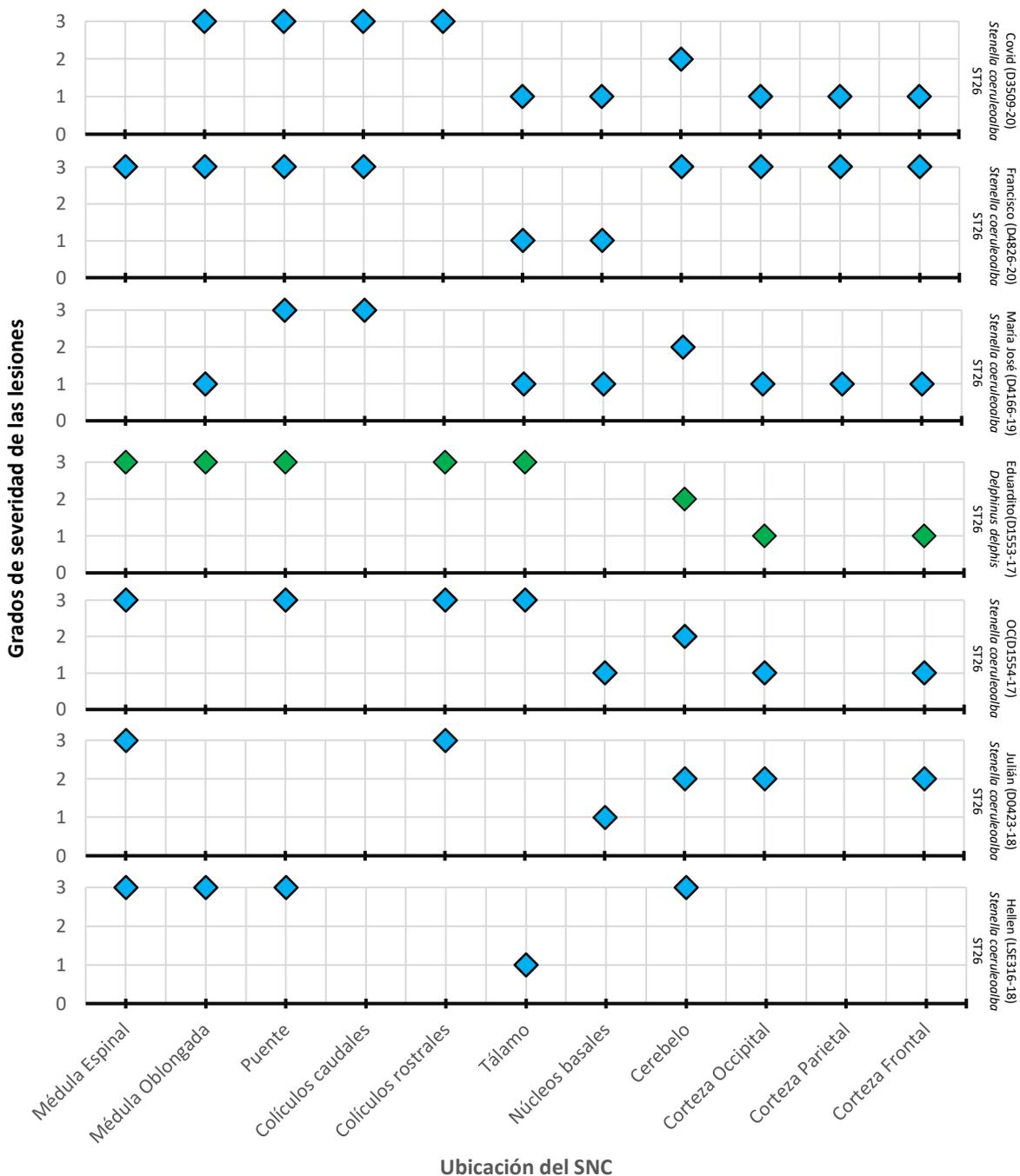


Figura 35. Perfiles parciales de las lesiones con diferentes grados de severidad. Casos de Covid, Francisco, María José, Eduardito, OC, Julián y Hellen. Casos positivos a los cultivos y caracterización de *Brucella ceti* ST26. Se les asignaron grados de severidad entre 1 y 3 en las diferentes ubicaciones del SNC.

Los otros dos casos positivos a *Brucella* spp. ST27 alcanzaron como máximo grado de severidad 1, tanto en áreas con meninges (cerebelo y corteza occipital) como en el parénquima cerebral (tálamo y núcleos basales) (Figuras 36 a la 38).

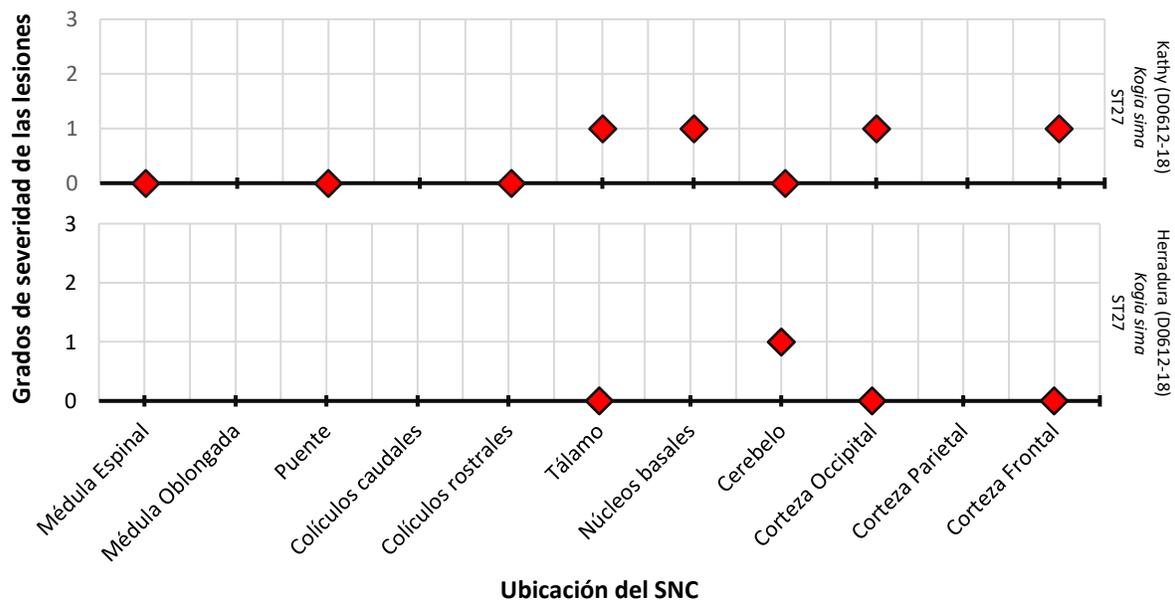


Figura 36. Perfiles parciales de las lesiones con diferentes grados de severidad. Casos de Kathy y Herradura. Casos positivos a los cultivos y caracterización de *Brucella* spp. ST27. Se les asignaron grados de severidad 1 en las diferentes ubicaciones del SNC.

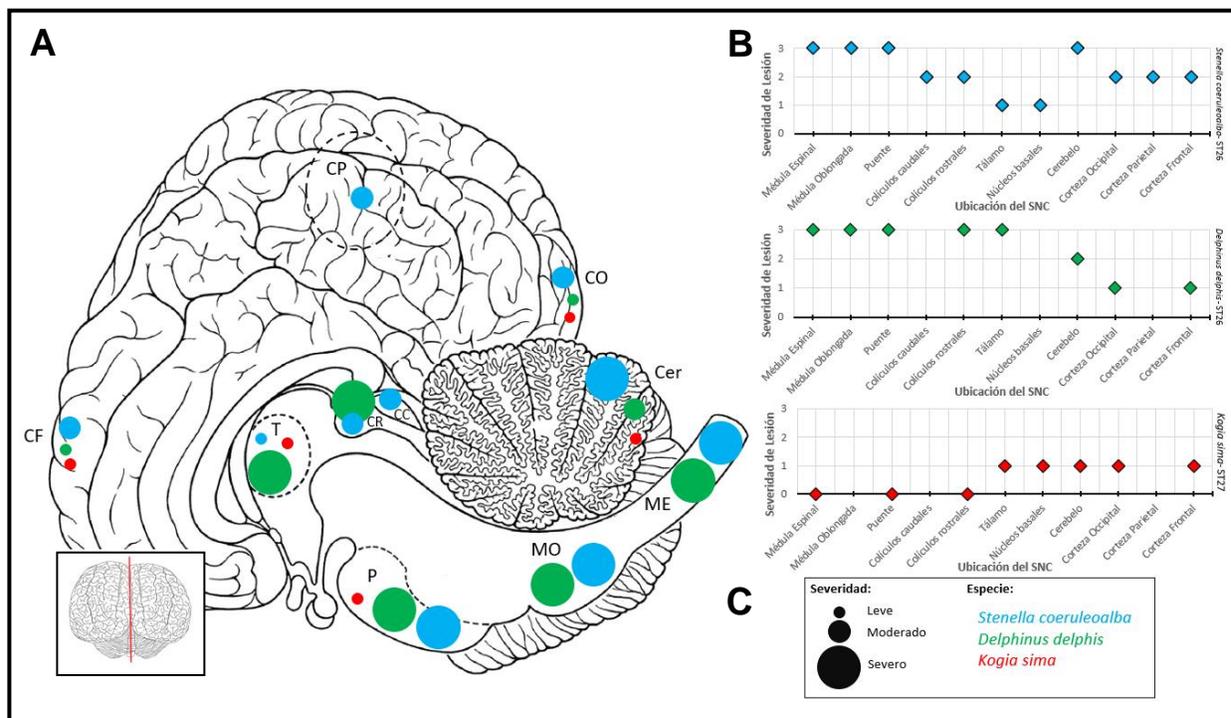


Figura 37. Diagrama con severidad de lesiones histopatológicas en vista medial del cerebro, corte sagital. (A) Distribución y severidad del infiltrado linfocítico en un corte sagital del cerebro de los cetáceos con meningoencefalomyelitis. El inserto izquierdo muestra la imagen dorsal del cerebro adaptada de: Cozzi et al. 2016. La línea roja indica el nivel sagital de corte utilizado. (B) Las especies con lesiones inflamatorias están representadas por diferentes colores. (C) Cada punto representa un foco inflamatorio y los 3 tamaños de puntos diferentes muestran diferentes grados de severidad (leve, moderado y severo). Abreviaturas: ME, médula espinal; MO, médula oblongada; P, puente; CC, colículos caudales; CR, colículos rostrales; T, tálamo; Cer, cerebelo; CO, corteza occipital; CP, corteza parietal; CF, corteza frontal.

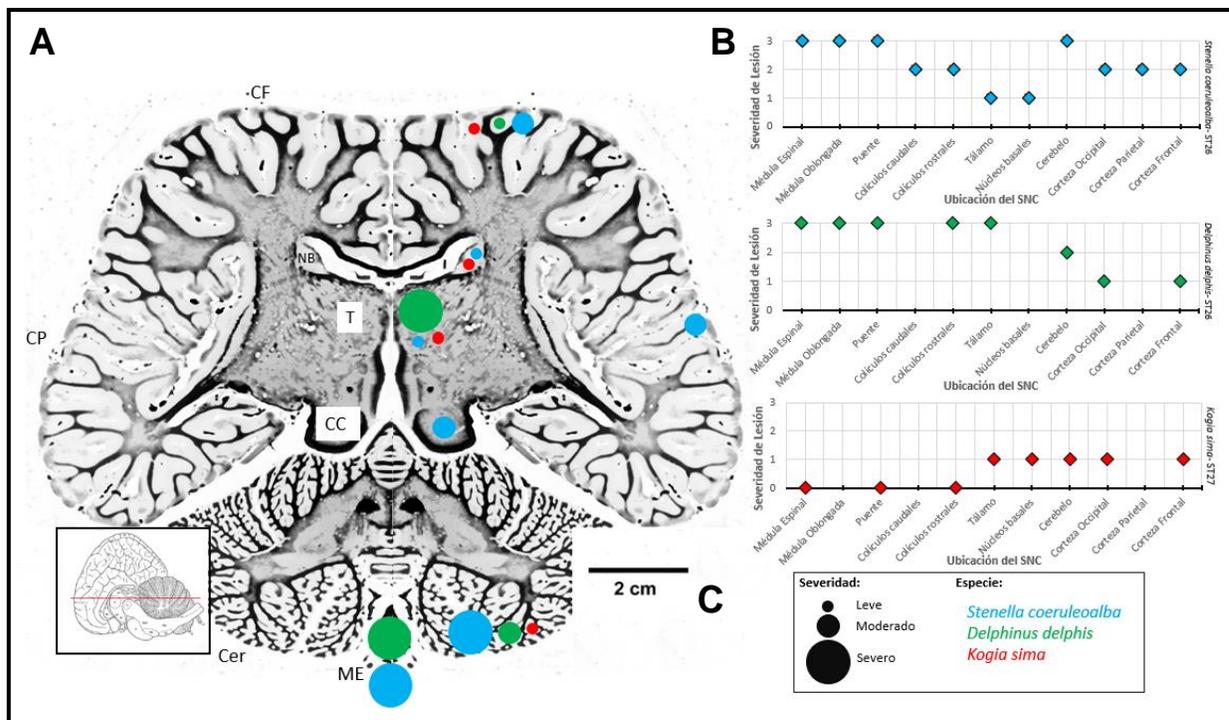


Figura 38. Diagrama con severidad de lesiones histopatológicas en vista dorsal del cerebro, corte horizontal. (A) Distribución y severidad del infiltrado linfocítico en un corte horizontal del cerebro de los cetáceos con meningoencefalomyelitis. El inserto izquierdo muestra la imagen lateral del cerebro adaptada de: Cozzi et al. 2016. La línea roja indica el nivel dorsal de corte utilizado. (B) Las especies con lesiones inflamatorias están representadas por diferentes colores. (C) Cada punto representa un foco inflamatorio y los 3 tamaños de puntos diferentes muestran diferentes grados de severidad (leve, moderado y severo). Abreviaturas: ME, médula espinal; CC, colículos caudales; T, tálamo; Cer, cerebelo; CP, corteza parietal; CF, corteza frontal.

Las principales lesiones del SNC asociadas a neurobrucelosis incluyen hemorragias multifocales, infiltrados perivasculares mononucleares y meningoencefalitis no supurativa, siendo más graves en el tronco encefálico y menos en el cerebro, también con infiltrados mononucleares. Estos infiltrados inflamatorios se han encontrado predominantemente conformados por linfocíticos y también por células

plasmáticas y macrófagos (Foster et al. 2002, González et al. 2002, Muñoz et al. 2006; Hernández-Mora et al. 2008; Davison et al. 2020).

En Costa Rica, también mostraron que las lesiones fueron más graves en la médula espinal, médula oblongada y cerebelo, y de moderada a leve en las cortezas cerebrales, así mismo, meninges hiperémicas y coroiditis mononuclear de moderada a grave en delfines rayados estudiados durante 2006-2008 (Hernández-Mora et al. 2008).

En el caso de *S. coeruleoalba* (n=10) y *D. delphis* (n=1), ambas especies presentaron un patrón en el perfil de las lesiones del sistema nervioso central muy similar, así como ha sido observado anteriormente por otros autores en *S. coeruleoalba* (Figuras 37 y 38) (González et al. 2002, Hernández-Mora et al. 2008). Para estos animales los perfiles de las lesiones presentaron una graduación severa en los tejidos donde había presencia de meninges, disminuyendo la severidad de caudal a craneal, es decir, la severidad fue mayor en la médula espinal, médula oblongada, puente, cerebelo y colículos en comparación con la corteza occipital, parietal y frontal. Un factor que hizo que los grados fueran más altos fue si el tejido se encontraba recubierto por meninges, ya que en las zonas donde no había meninges, aunque presentaron lesiones en el parénquima cerebral, estos obtuvieron grados de severidad inferiores en tálamo y núcleos basales (Figuras 37 y 38).

En contraste, los otros dos casos positivos a *Brucella* spp. ST27, incluidos en esta práctica dirigida, fueron de la especie *K. sima*. Estos animales presentaron un patrón diferente en el perfil de la lesión, ya que la graduación fue leve en zonas con meninges como el cerebelo y corteza occipital, y se obtuvieron mismos grados áreas

parenquimatosas como tálamo y núcleos basales. Actualmente no se encontraron descripciones publicadas de las lesiones que causa esta cepa ST27 en el SNC, los reportes hasta el momento en cetáceos corresponden a placentitis con reporte de aborto, correspondiente al caso incluido en esta práctica dirigida de la especie *K. sima* (Suárez-Esquivel et al. 2019, Hernández-Mora et al. 2021) y a un *T. truncatus* en Australia (Mackie et al. 2020), sin embargo, anteriormente se evidenció que esta cepa puede generar neurobrucelosis con un grado leve de lesiones en parénquima y áreas con meninges para la especie *K. sima*.

3.4.4. Grado 0

Los siete casos que resultaron negativos a *Brucella* spp., no presentaron ningún tipo de infiltrado inflamatorio perivascular ni en meninges del SNC (Figuras 39 y 40).

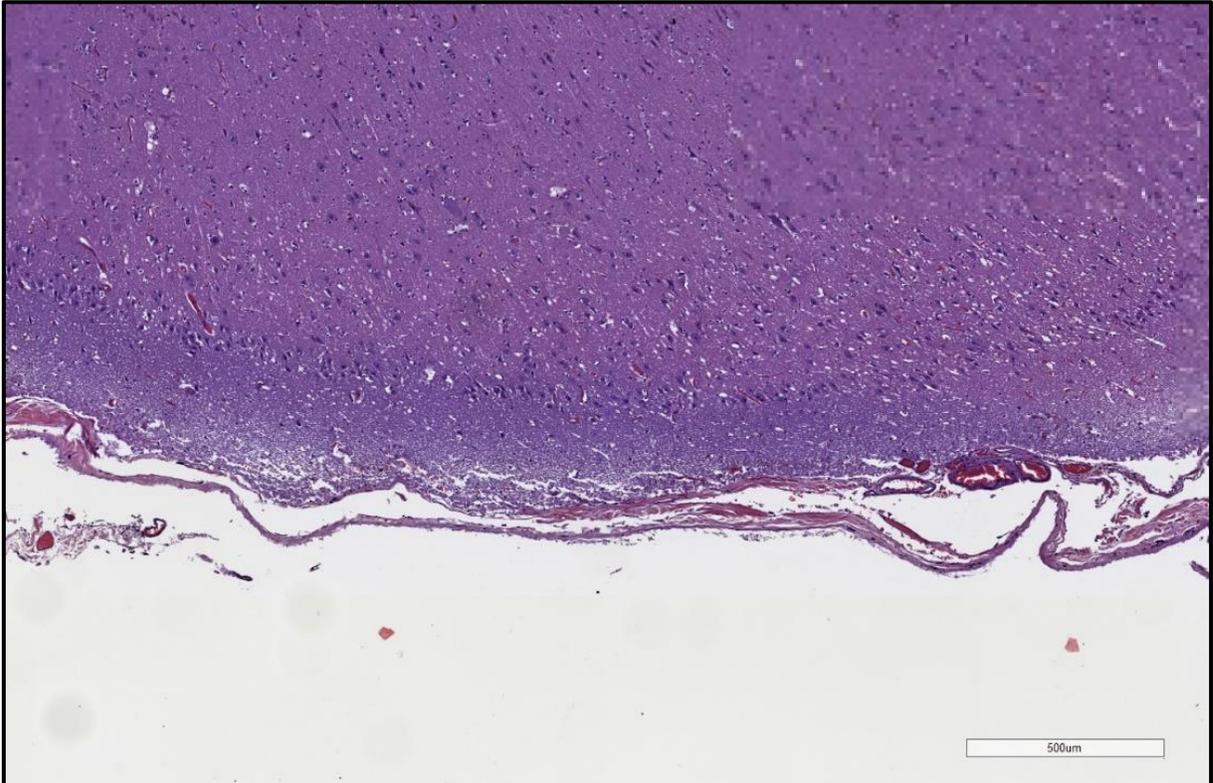


Figura 39. Corte histológico de cerebro y meninges sin infiltrado inflamatorio de Vico. Tinción hematoxilina-eosina. Barra=500 μ m, 5x.

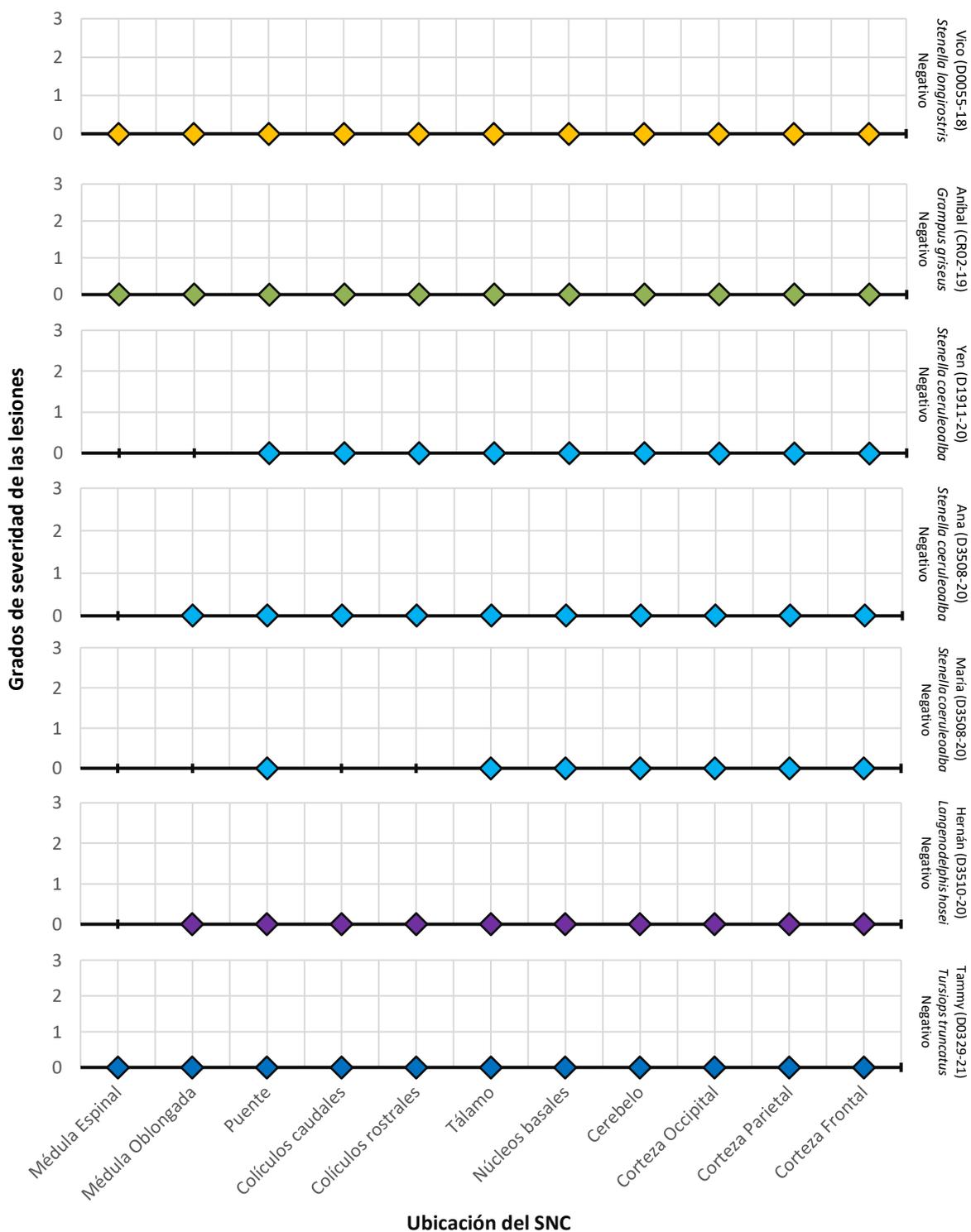


Figura 40. Perfiles totales y parciales de las lesiones con grado de severidad 0. Casos de Vico, Anibal, Yen, Ana, María, Hernán y Tammy. No presentaron ninguna lesión asociada a infiltrado linfocítico.

La ausencia de casos de neurobrucelosis en las especies *Tursiops truncatus* (n=1), *Langenodelphis hosei* (n=1), *Grampus griseus* (n=1), *Stenella longirostris* (n=1) y *Stenella coeruleoalba* (n=3) encalladas durante el periodo de la práctica dirigida puede explicarse, exceptuando *S. coeruleoalba*, por el bajo número de animales sometidos a los estudios de necropsia y cultivos bacteriológicos, no obstante, estas especies se han reportado como serológicamente positivas en estudios previos (Hernández-Mora et al. 2009). Otra hipótesis aparte del bajo número de individuos estudiados podría ser que son especies con poca susceptibilidad a la invasión del SNC por parte de *B. ceti*, tal y como sucede con otros mamíferos terrestres, ya que estas especies son poco reportadas como encalladas en nuestro país, a diferencia de los delfines rayados.

También en los animales positivos a *Brucella ceti* ST 26 se encontraron otros tipos de lesiones, diez con hiperemia y hemorragia, diez presentaron poliradiculoneuritis, cuatro con coroiditis, dos ventriculitis, todos con infiltrado linfocítico (Figura 41 a la 43).

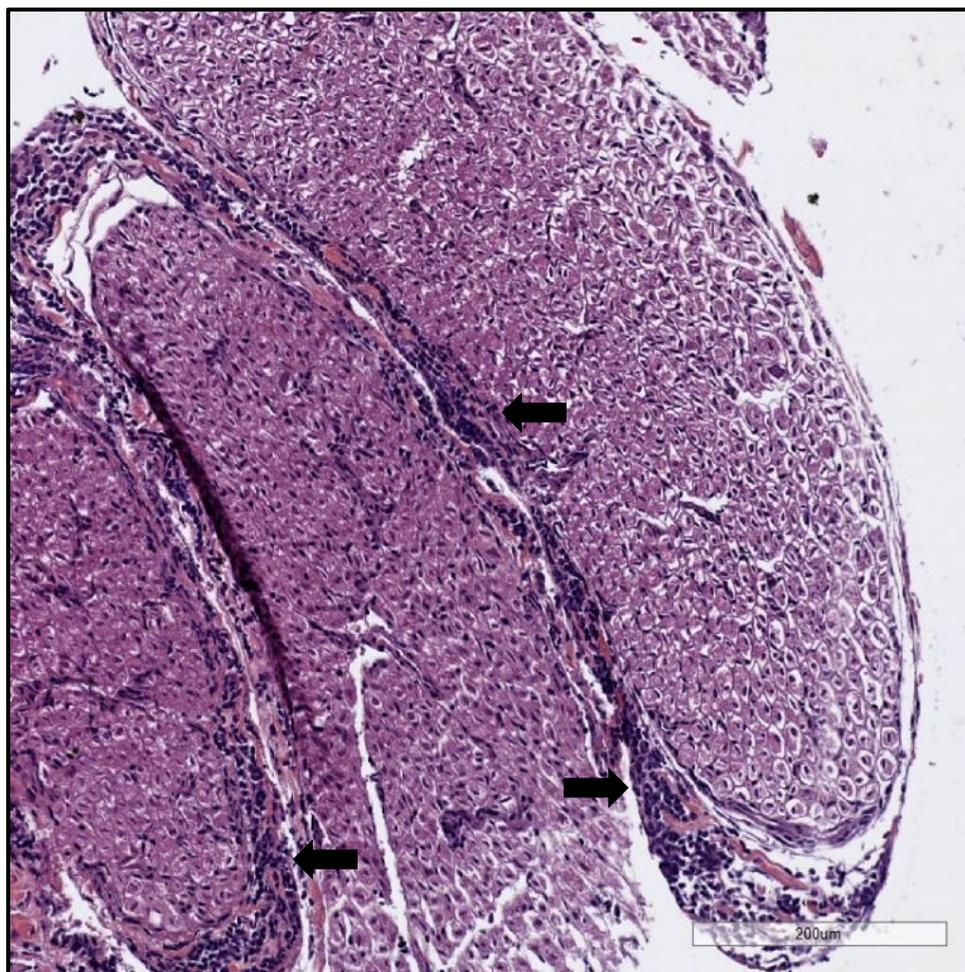


Figura 41. Corte histológico transversal de médula espinal con poliradiculoneuritis de *Chiibal Kiin*. Infiltrado moderado de linfocitos en las meninges que rodean las raíces de nervios (flechas). Tinción hematoxilina-eosina. Barra=200 μ m, 6x.

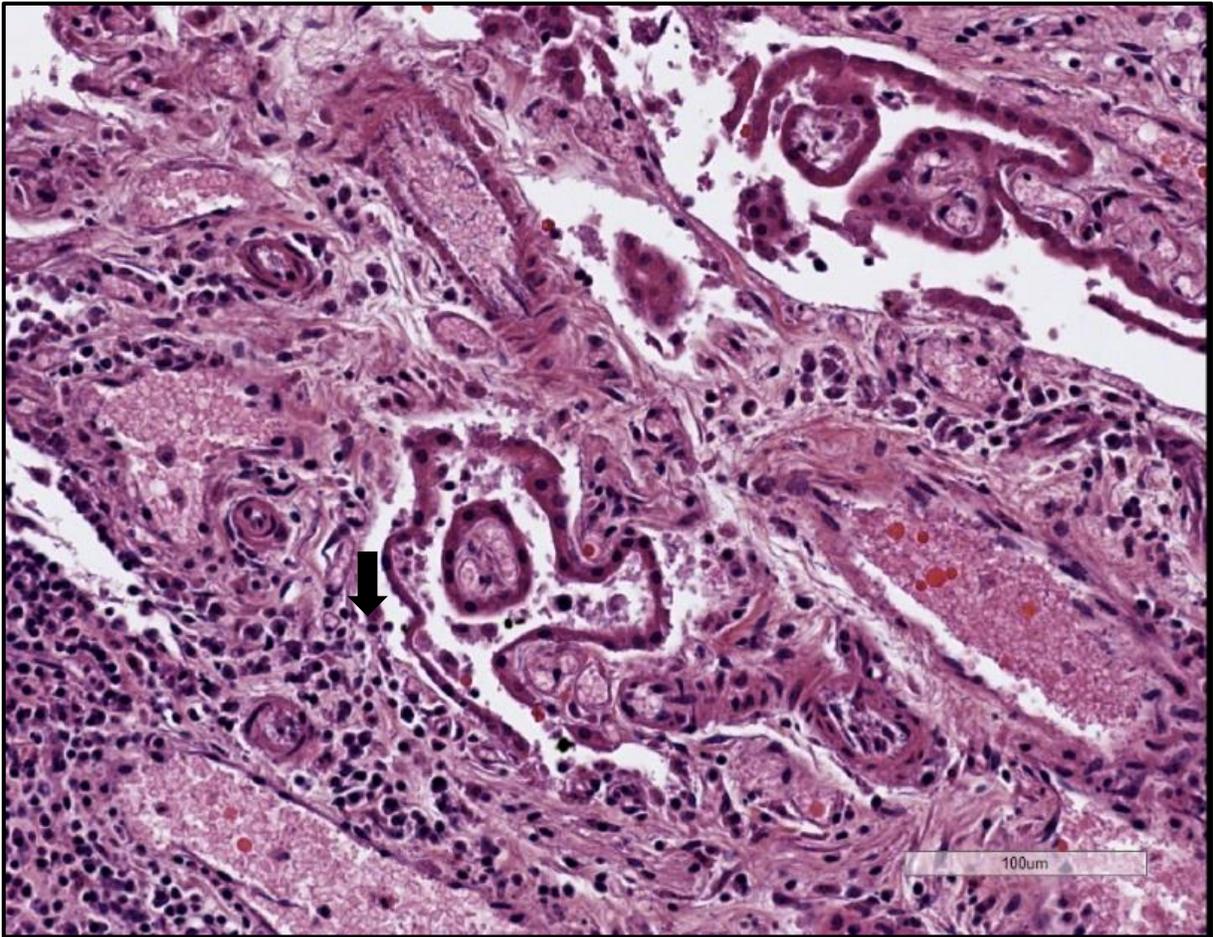


Figura 42. Corte histológico del plexo coroideo del IV ventrículo de la médula oblongada con coroiditis de Fernanda. Infiltrado moderado de linfocitos expandiendo el estroma del plexo coroideo (flecha). Tinción hematoxilina-eosina. Barra=100 μ m, 20x.

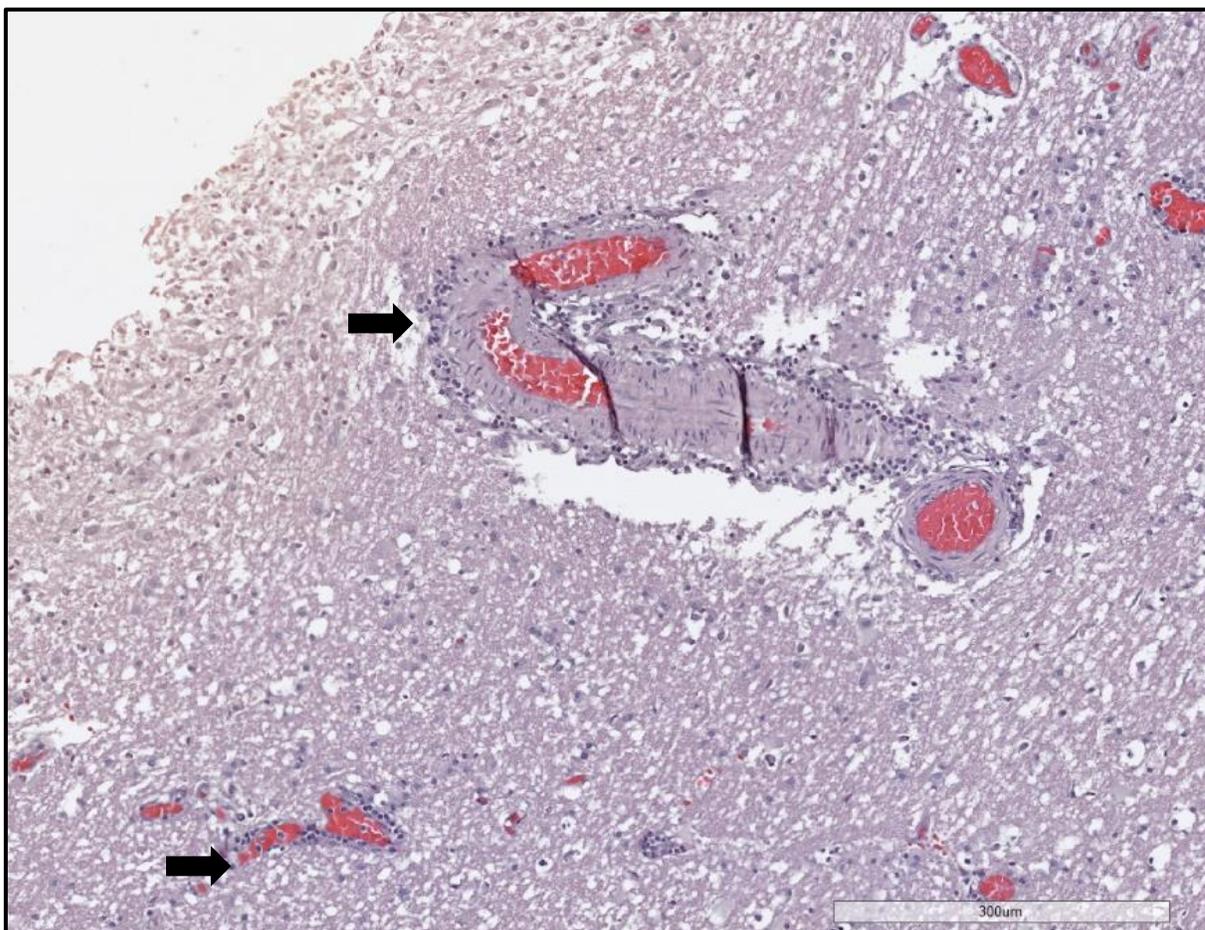


Figura 43. Corte histológico de la pared del ventrículo lateral de Eduardito. Infiltrado leve perivascular (flechas). Tinción hematoxilina-eosina. Barra=300 μ m, 8x.

Adicionalmente, algunos trastornos hemodinámicos fueron encontrados, tales como hiperemia y hemorragia en todos los casos positivos a *Brucella ceti*, en al menos uno de los tejidos evaluados del SNC, estos hallazgos han sido anteriormente reportados en cetáceos con neurobrucelosis (González-Barrientos et al. 2010, Sierra et al. 2019), no obstante, este también fue un hallazgo en animales negativos, por lo que este es considerado un hallazgo inespecífico comúnmente encontrado en animales encallados (Xiang et al. 2013) y no específicamente asociado a

neurobrucelosis. Así mismo, se encontraron otras características particulares causados por neurobrucelosis, algunos autores han descrito que la meningoencefalitis además de los infiltrados mononucleares puede incluir poliradiculoneuritis, coroiditis, ventriculitis (González et al. 2002, Hernández-Mora et al. 2008, González-Barrientos et al. 2010, Nymo et al. 2011, Sierra et al. 2020), sin embargo, estos hallazgos tampoco son específicos de la neurobrucelosis porque se han descrito en otras afecciones del SNC por otros agentes infecciosos como Morbillivirus, Herpesvirus, *Toxoplasma gondii* y *Nasitrema* sp (Sierra et al. 2020).

Además, en el caso de AKA Hernán se encontraron cuerpos de Lafora en las cortezas cerebrales (Figura 44).

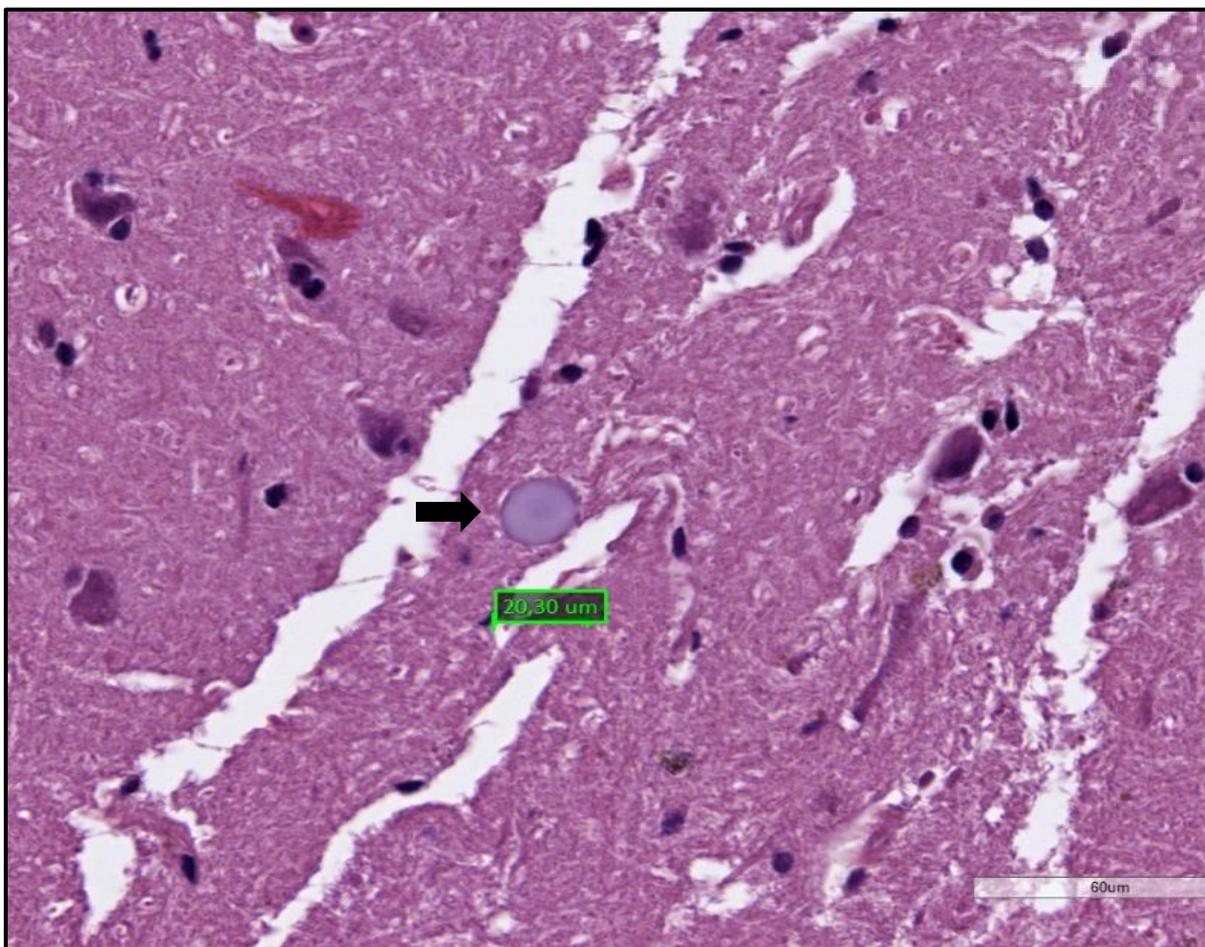


Figura 44. Corte histológico de corteza frontal de Hernán con inclusión de un cuerpo de Lafora en neuroparénquima (flecha). Tinción hematoxilina-eosina. Barra=60 μ m, 40x.

Los cuerpos de Lafora descritos en el caso del delfín de Fraser (AKA Hernán) en diferentes áreas de la corteza cerebral, es un hallazgo que no se ha reportado en cetáceos. En medicina humana es una alteración ampliamente estudiada, donde los cuerpos de Lafora se han descrito como la acumulación intracelular de agregados que contienen poliglucosanos, los cuales se encuentran con menor número de ramificaciones y de distribución anormal, algunas también pueden estar compuestas por proteínas ubiquitinadas, estas inclusiones pueden acumularse en diferentes

órganos tales como cerebro, hígado, glándulas sudoríparas, músculo cardíaco y músculo esquelético (Lafora y Glueck 1911, Harriman et al. 1955, Berkovic et al. 1986). En este caso el hallazgo no se asocia a ninguna alteración de salud significativa, debido a la condición de adulto, se considera una presentación incidental de los cuerpos de Lafora, a menudo, reportados en animales de edad avanzada, este hallazgos han sido reportado en otros animales terrestres como perros, gatos, vacas, mapaches, murciélagos y zorros (Hall et al. 1998, Gabor y Srivastava 2010, Honnold et al. 2010, Hamir 2011, Wohlsein P et al. 2012, Swain et al. 2017), sin embargo, este reporte, representa el primer caso documentado en cetáceos específicamente en *L. hosei*.

Se resumen los hallazgos de todos los casos incluidos en esta práctica dirigida en el Cuadro 6.

Cuadro 6. Hallazgos y lesiones asociadas en virtopsia, necropsia, bacteriología, histopatología y serología de los casos estudiados durante el periodo 2017-marzo 2021.

Identificación	Ventriculomegalia	B. cetii	Histopatología	Otras lesiones histopatológicas asociadas	Serología a brucelosis
Vico	Negativa	Negativo	Sin inflamación	Ninguna	Negativo
Aníbal	Negativa	Negativo	Sin inflamación	Hiperemia y hemorragia	Negativo
Yen	Negativa	Negativo	Sin inflamación	Hiperemia y hemorragia	Negativo
Ana	Negativa	Negativo	Sin inflamación	Hiperemia y hemorragia	Negativo
María	Negativa	Negativo	Sin inflamación	Hiperemia y hemorragia	Negativo
Tammy	Negativa	Negativo	Sin inflamación	Hiperemia y hemorragia	Negativo
Hernán	Leve	Negativo	Sin inflamación	Ninguna	Positivo
Eduardito	No especificada	ST26	Meningoencefalitis	Hiperemia, hemorragia, poliradiculoneuritis, coroiditis y ventriculitis	Positivo
OC	No especificada	ST26	Meningoencefalitis	Hiperemia, hemorragia, poliradiculoneuritis, coroiditis y ventriculitis	Positivo
Chiibal Kiin	No especificada	ST26	Meningoencefalitis	Hiperemia y hemorragia	Positivo
Irmo	No especificada	ST26	Meningoencefalitis	Hiperemia, hemorragia y poliradiculoneuritis	Positivo
Hellen	No especificada	ST26	Meningoencefalitis	Poliradiculoneuritis	Positivo
Raúl	No especificada	ST26	Meningoencefalitis	Poliradiculoneuritis y coroiditis	Positivo
Kathy	No especificada	ST27	Meningoencefalitis	Hiperemia y hemorragia	Positivo
Herradura	No especificada	ST27	Meningoencefalitis	Hiperemia y hemorragia	Positivo
Julián	Leve	ST26	Meningoencefalitis	Hiperemia, hemorragia y poliradiculoneuritis	Positivo
Francisco	Leve	No Caracterizado	Meningoencefalitis	Hiperemia, hemorragia y poliradiculoneuritis	Positivo
Randy	Moderada	ST26	Meningoencefalitis	Hiperemia, hemorragia y poliradiculoneuritis	Positivo
María José	Moderada	ST26	Meningoencefalitis	Hiperemia y hemorragia	Positivo
Fernanda	Severa	ST26	Meningoencefalitis	Hiperemia, hemorragia, poliradiculoneuritis y coroiditis	Positivo
Covid	Severa	ST26	Meningoencefalitis	Ninguna	Positivo

La neurobrucelosis o infección por bacterias del género *Brucella* en el SNC, es una de las complicaciones más graves de la brucelosis en los seres humanos en países endémicos, reportándose de un 0.5% al 37.5 % en los pacientes humanos no tratados por brucelosis (Shakir et al. 1987, Lubani et al. 1989, McLean et al. 1992, Guven et al. 2013, Gul, Obiako et al. 2010 y Erdem 2017). A pesar de esto, la neurobrucelosis en humanos a menudo puede ser subdiagnosticada, resultando en la administración del tratamiento inadecuado y presentándose como una grave enfermedad debilitante e incapacitante (Buzgan et al. 2010, Zheng et. al 2018).

Esta complicación se caracteriza por meningoencefalitis, descrita en más del 90% de los pacientes con neurobrucelosis; sin embargo, otras formas pueden incluir meningitis, encefalitis, enfermedad meningovascular, abscesos cerebrales, síndromes desmielinizantes y mielitis (Baldi y Giambartolomei 2013, Qasim et al. 2021). Estas presentaciones incluyen cambios inflamatorios en el parénquima cerebral y meninges con infiltrados linfocitarios y células plasmáticas, que dan como resultado la hidrocefalia con significativa dilatación de los ventrículos y en ocasiones con formación de granulomas (Sohn et al. 2003, Altas et al. 2010).

A pesar de la incidencia de neurobrucelosis en humanos, solo existen escasos informes que documenten los cambios histopatológicos de esta infección en el sistema nervioso central, dejando un enorme vacío de información sobre la patogénesis de esta enfermedad (Seidel et al. 2003, Krishnan et al. 2005).

A nivel mundial, los casos humanos infectados por *Brucella* marina son pocos, sin embargo, *Brucella* spp. ST27 se ha aislado de estos casos y han presentado al igual que los delfines descritos en este estudio, neurobrucelosis y afecciones a nivel osteoarticular

(Sohn et al. 2003, McDonald et al. 2006, Whatmore et al. 2008, Maquart et al. 2010, Cloeckaert et al. 2001, Cloeckaert et al. 2011). Los estudios epidemiológicos han relacionado estas infecciones a la ingestión de pescados y mariscos crudos y no a la exposición directa a mamíferos marinos, lo que evidencia la necesidad de investigación para conocer otros posibles reservorios en ambientes marinos (Sohn et al. 2003, McDonald et al. 2006).

Aparte de los humanos y los cetáceos, esta complicación, rara vez se reporta en animales domésticos (bovinos, caprinos, ovinos, porcinos o caninos) y otros animales salvajes, en general, se considera como poco descrita, así como también carece de descripciones detalladas en la literatura del mecanismo y vía de ingreso superando la barrera hematoencefálica, su mecanismo de permanencia y progreso en los organismos infectados.

De los cetáceos encallados durante 2017 a marzo 2021, 15 casos (72%) presentaron serología positiva a brucelosis y tenían al menos una lesión en el SNC, de estos se obtuvieron 14 animales (67%) positivos con aislamiento de *Brucella* spp. De siete que presentaron diferentes severidades de ventriculomegalia por virtopsia, seis animales (86%) resultaron positivos a *Brucella* spp. Y el **93%** de los animales positivos en los estudios bacteriológicos presentaron meningoencefalitis. Lo anterior demuestra la importancia de realizar estudios complementarios de serología, bacteriología, histopatología, e imagenología para un abordaje integral y de mayor comprensión de esta infección a nivel de sistema nervioso central.

Además, con estos resultados es evidente que independientemente de la severidad de ventriculomegalia mostrada, los animales pueden encallar y presentar afectaciones

neurológicas con presencia de *Brucella ceti* ST 26 o *Brucella* spp. en el SNC, reflejando un diagnóstico robusto y una fuerte asociación entre los hallazgos.

Los cetáceos encallados por lo tanto pueden generar valiosa información para el estudio de la neurobrucelosis en seres humanos y servir de base para comprender la fisiopatología de la enfermedad en SNC (Guzmán-Verri et al. 2012).

La información generada con esta práctica dirigida evidencia que las medidas de bioseguridad y precaución deben ser estrictas, especialmente cuando se manejan o manipulan mamíferos marinos en las playas y en todos los procedimientos de estudio para la toma y procesamiento de muestras ya sea en virtopsia, necropsia y en laboratorio, ya que el potencial zoonótico de estas cepas marinas siempre está presente (Suárez-Esquivel et al. 2019, Sierra et al. 2019, Hernández-Mora et al. 2021).

Es evidente entonces la necesidad de la integración entre la investigación biomédica, la medicina de conservación y la salud pública para brindar respuestas al desafío de las enfermedades zoonóticas emergentes en fauna silvestre tanto terrestre como marina y brindar un abordaje acorde a las necesidades de las especies mayormente afectadas por condiciones adversas de medio ambiente y por el impacto del ser humano en estas.

4. CONCLUSIONES

1. Se interpretó mediante la virtopsia por TACPM los hallazgos del SNC, lo cual permitió comprender de una manera amplia los posibles hallazgos por neurobrucelosis para determinar el grado de severidad de la ventriculomegalia, además se interpretaron hallazgos del SOA, que complementan los hallazgos que se pueden encontrar en la necropsia convencionalmente.

2. En las necropsias se evaluaron las lesiones del SNC causadas por la neurobrucelosis, asimismo se pudo realizar una necropsia más detallada para corroborar los hallazgos de la virtopsia en el SOA.
3. Se identificó la presencia de *B. ceti* en el SNC mediante los cultivos y caracterización bacteriológica.
4. Se describió y graduó la severidad de las lesiones histopatológicas del SNC.

5. RECOMENDACIONES PARA EL SENASA

Continuar utilizando las técnicas de diagnóstico utilizadas en este trabajo fina de graduación para los cetáceos que encallen en Costa Rica, así como también se pueden replicar en otras especies que se quieran estudiar a fondo el sistema nervioso central.

Las autoridades del Servicio Nacional de Salud Animal puede entrenar y capacitar al personal de Guardacostas, Bomberos, SINAC, entre otros, quienes son los primeros en llegar a ayudar al animal para evitar cualquier riesgo de infección del personal con las enfermedades que pueden estar afectando la salud de los cetáceos que encallan.

Este tipo de práctica dirigida ejemplifica el concepto de una salud, donde se vincula la salud pública con la salud de los animales y la salud del ecosistema, debido a que la brucelosis marina es potencialmente zoonótica, se debe continuar con el monitoreo activo de los cetáceos que encallan en nuestro país y así obtener información que permita dar seguimiento al estado de salud de las poblaciones marinas de cetáceos, además de continuar aprendiendo sobre la fisiopatología de la neurobrucelosis y otras enfermedades infecciosas y no infecciosas que generan la continua mortalidad anual de las poblaciones.

Con respecto a la toma de imágenes mediante TACPM, el animal debe encontrarse lo más fresco posible y si se congela, se debe mantener en una posición horizontal para que al momento de la reconstrucción de imágenes del animal estas puedan obtenerse en posiciones anatómicas lo más normales posibles.

Durante la necropsia se debe realizar una revisión detallada de la condición corporal de cada cetáceo encallado para asociarlo con el grado de severidad de una infección asociada a dicho evento y también se recomienda tomar siempre muestras suficientes

de médula espinal cervical y medir la totalidad de LCR en animales con ventriculomegalia. Además, se debe realizar la necropsia lo más cercano a la fecha de encallamiento del animal, para evitar alteraciones por descomposición y en caso de que se congele evitar la severa congelación de los tejidos, especialmente del SNC.

Por último, se recomienda generar reportes individuales que incluyan fotos detalladas de cada hallazgo en todos los casos para que toda la información obtenida pueda ser fácilmente accesible a través del tiempo.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Al-Sous M, Bohlega S, Al-Kawi M, Alwatban J, McLean D. 2004. Neurobrucellosis: Clinical and Neuroimaging Correlation. *AJNR. American journal of neuroradiology.* 25. 395-401.

Alton G, Jones L, Angus R, Verger J. 1988. *Techniques for the brucellosis laboratory.* Paris: INRA. 190 p.

Altas M, Evirgen O, Arica V, Tutanc M. 2010. Pediatric neurobrucellosis associated with hydrocephalus. *J Pediatr Neurosci.* 5:144–146.

Arbelo M, Espinosa A, Herráez P, Andrada M, Sierra E, Rodríguez F, Jepson P, Fernández A. 2013. Pathology and causes of death of stranded cetaceans in the Canary Islands (1999-2005). *Dis Aquat Organ.* 103(2): 87-99.

Baglivo M, Winklhofer S, Hatch G, Ampanozi G, Thali M, Ruder T. 2013. The rise of forensic and post-mortem radiology—Analysis of the literature between the year 2000 and 2011. *Journal of Forensic Radiology and Imaging.* 1(1): 3-9.

Baldi, P y Giambartolomei G. 2013. Immunopathology of *Brucella* infection. *Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery.* 8(1): 18–26.

Berkovic S, Andermann F, Carpenter S, Wolfe L. 1986. Progressive Myoclonus Epilepsies: Specific Causes and Diagnosis. *N Engl J Med.* 315(5): 296-305.

Bearzi G, Bonizzoni S, Agazzi S, Gonzalvo J, Currey R. 2011. Striped dolphins and short-beaked common dolphins in the Gulf of Corinth, Greece: Abundance estimates from dorsal fin photographs. *Mar. Mamm. Sci.* 27: 165-184.

Bradley W. 2001. Diagnostic tools in hydrocephalus. *Neurosurgery clinics of North America*. 12 (4): 661-684.

Brew S, Perrett L, Stack J, MacMillan A, Staunton N. 1999. Human exposure to *Brucella* recovered from a sea mammal. *Vet Rec*. 144(17): 483-485.

Buzgan T, Karahocagil M, Irmak H, Baran A, Karsen H, Evirgen O, AkdenizH. 2010. Clinical manifestations and complications in 1028 cases of brucellosis: a retrospective evaluation and review of the literature. *International Journal of Infectious Diseases*. 14(6): 469-478.

Chan D, Tsui H, Kot B. 2017. Database documentation of marine mammal stranding and mortality: current status review and future prospects. *Dis. Aquat. Org*. 126: 247-256.

Cloeckaert A, Verger J, Grayon M, Paquet J, Garin-Bastuji B, Foster G, Godfroid J. 2001. Classification of *Brucella* spp. isolated from marine mammals by DNA polymorphism at the omp2 locus. *Microbes Infect*. 3: 729-738.

Cloeckaert A, Bernardet N, Koylass M, Whatmore A, Zygmunt M. 2011. Novel IS711 chromosomal location useful for identification of marine mammal *Brucella* genotype ST27, which is associated with zoonotic infection. *J. Clin. Microbiol*. 49: 3954-3959.

Colegrove K, Venn-Watson S, Litz J, Kinsel M, Terio K, Fougères E, Ewing R, Pabst D, McLellan W, Raverty S, Saliki J, Fire S, Rappucci G, Bowen-Stevens S, Noble L, Costidis A, Barbieri M, Field C, Smith S, Rowles T. 2016. Fetal distress and in utero pneumonia in perinatal dolphins during the Northern Gulf of Mexico unusual mortality event. *Diseases of Aquatic Organisms*. 119: 1-16.

Cowan J, McGirt M, Woodworth G, Rigamonti D, Williams M, 2005. The syndrome of

hydrocephalus in young and middle-aged adults (SHYMA). *Neurol Res.* 27:540-547.

Hamilton M. 2009 Treatment of hydrocephalus in adults. *Semin Pediatr Neurol.* 16: 34-41.

Cowan D, Whitehead H, Ronje E. 2010. Meningitis and hydrocephalus: A Clinicopathological Study of 19 Cases in Atlantic Bottlenose Dolphins (*Tursiops truncatus*) from the Texas Marine Mammal Stranding Network. In: Proceedings of Annual Meeting of the International Association for Aquatic Animal Medicine, 2009 May 7–11; Galveston, USA. San Antonio (TX): International Association for Aquatic Animal Medicine.

Cozzi B, Huggenberger S, Oelschläger H. 2016. Anatomy of Dolphins: Insights into Body Structure and Function. London: Academic Press. 203-255p.

Cranford T, Amundin M, Norris K. 1996. Functional morphology and homology in the odontocete nasal complex: implications for sound generation. *J. Morphol.* 228(3): 223–285.

Craven C, Ramkumar R, D'Antona L, Thompson S, Thorne L, Watkins L, Toma A. 2019. Natural history of ventriculomegaly in adults: a cluster analysis. *Journal of Neurosurgery.* 10.3171/2018.8.JNS18119.

Cvetnić Ž, Duvnjak S, Đuras M, Gomerčić T, Reil I, Zdelar-Tuk M, Spicic S. 2016. Evidence of *Brucella* strain ST27 in bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) in Europe. *Veterinary Microbiology.* 196.

Dagleish M, Barley J, Howie F, Reid R, Herman J, Foster G. 2007. Isolation of *Brucella* species from a diseased atlanto-occipital joint of an Atlantic white-sided dolphin

(*Lagenorhynchus acutus*). Vet. Rec. 160: 876-878.

Davison N, Barnett J, Perrett L, Dawson C, Perkins M, Deaville R, Jepson P. 2013. Meningoencephalitis and arthritis associated with *Brucella ceti* in a short-beaked common dolphin (*Delphinus delphis*). J Wildl Dis. 49(3):632-636.

Davison N. 2020. The lesion profile of cetaceans diagnosed with neurobrucellosis in Scottish waters 1990 to March 2019. (Masters by Research Thesis). The University of Edinburgh, Scotland.

Davison N, Dagleish M, Ten Doeschate M, Muchowski J, Perrett L, Rocchi M, Whatmore A, Brownlow A. 2021a. Meningoencephalitis in a common minke whale *Balaenoptera acutorostrata* associated with *Brucella pinnipedialis* and alpha-herpesvirus infection. Diseases of Aquatic Organisms. 144.

Davison N, Brownlow A, Doeschate M, Dale E, Foster G, Muchowski J, Perrett L, Rocchi M, Whatmore A, Dagleish M. 2021b. Neurobrucellosis due to *Brucella ceti* ST26 in Three Sowerby's Beaked Whales (*Mesoplodon bidens*). J Comp Pathol. 182: 1-8.

Davson H, Hollingsworth G, Segal M. 1970. The mechanism of drainage of the cerebrospinal fluid. Brain. 93: 655-678.

Dawson C, Stubberfield E, Perrett L, King A, Whatmore A, Bashiruddin J, Stack J, MacMillan A. 2008. Phenotypic and molecular characterization of *Brucella* isolates from marine mammals. BMC Microbiol. 8: 224.

De Miguel M, Marín C, Muñoz P, Dieste L, Grilló M, Blasco J. 2011. Development of a selective culture medium for primary isolation of the main *Brucella* Species. Journal of Clinical Microbiology. 49(4): 1458-1463.

Di Guardo G, Proietto U, Di Francesco C, Marsilio F, Zaccaroni A, Scaravelli D, Mignone W, Garibaldi F, Kennedy S, Foster F, et al. 2010. Cerebral toxoplasmosis in striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*) stranded along the Ligurian Sea coast of Italy. *Vet Pathol.* 47(2): 245-253.

Domingo M, Visa J, Pumarola M, Marco A, Ferrer L, Rabanal R, Kennedy S. 1992. Pathologic and immunocytochemical studies of morbillivirus infection in striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*). *Vet Pathol.* 29(1): 1–10.

Duvnjak S, Špičić S, Kušar D, Papić B, Reil I, Zdelar-Tuk M, Pavlinec Ž, Đuras M, Gomerčić T, Hendriksen R, Cvetnić Ž. 2017. Whole-Genome Sequence of the First Sequence Type 27 *Brucella ceti* Strain Isolated from European Waters. *Genome announcements.* 5 (37): e00988-17

Ewalt D, Payeur J, Martin B, Cummins D, Miller W. 1994. Characteristics of a *Brucella* species from a bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). *J Vet Diagn Investig.* 6 (4): 448-452.

Foster G, MacMillan A, Godfroid J, Howie F, Ross H, Cloeckert A, Reid R, Brew S, Patterson I. 2002. A review of *Brucella* sp. infection of sea mammals with particular emphasis on isolates from Scotland. *Vet Microbiol.* 90: 563-580.

Foster G, Osterman B, Godfroid J, Jacques I, Cloeckert A. 2007. *Brucella ceti* sp. nov. and *Brucella pinnipedialis* sp. nov. for *Brucella* strains with cetaceans and seals as their preferred hosts. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57, 2688–2693.

Foster G, Whatmore A, Koylass M, Perrett L, Dagleish M, Reid B. 2011. Smooth and rough strains of *Brucella ceti* recovered from different tissues in a stranded harbour

porpoise (*Phocoena phocoena*), in Brucellosis 2011 International Research Conference, Buenos Aires, 89.

Frantzis A, Herzing D. 2002. Mixed-species associations of striped-dolphins (*Stenella coeruleoalba*), short-beaked common dolphins (*Delphinus delphis*), and Risso's dolphins (*Grampus griseus*) in the Gulf of Corinth (Greece, Mediterranean Sea). *Aquat Mamm.* 28:188-197.

Gabor L, Srivastava M. 2010. Polyglucosan inclusions (Lafora bodies) in a gray-headed flying fox (*Pteropus poliocephalus*). *J Vet Diagn Invest.* 22(2): 303-304.

Galatius A, Sonne C, Kinze C, Dietz R, Jensen J. 2009. Occurrence of vertebral osteophytosis in a museum sample of white-beaked dolphins (*Lagenorhynchus albirostris*) from Danish waters. *J Wildl Dis.* 45(1): 19–28.

Geraci J, Lounsbury V. 2005. *Marine Mammals Ashore: A Field Guide for Strandings.* 2nd ed. Baltimore (MD): National Aquarium in Baltimore. 75-354 p.

Giorda F, Ballardini M, Di Guardo G, Pintore M, Grattarola C, Iulini B, Mignone W, Gorla M, Serracca L, Varello K, et al. 2007. Postmortem findings in cetaceans found stranded in the Pelagos sanctuary, Italy. *J Wildl Dis.* 53(4): 795-803.

González-Barrientos R. 2008. Estudios anátomo-histopatológicos e inmunohistoquímicos sobre las patologías de los cetáceos encallados en Costa Rica durante el periodo 2001-2007. Con énfasis especial en el diagnóstico de *Brucella* y Morbilivirus. (Tesis de grado). Universidad Nacional, Costa Rica.

González-Barrientos R, Morales J, Hernández-Mora G, Barquero-Calvo E, Guzmán-Verri C, Chaves-Olarte E, Moreno E. 2010. Pathology of striped dolphins (*Stenella*

coeruleoalba) infected with *Brucella ceti*. J Comp Pathol. 142(4): 347–352.

González J, Martínez C, Bocanegra I. 2010. Presentación aguda de neurobrucelosis en un paciente pediátrico. Reporte de un caso. Enfermedades Infecciosas y Microbiología. 30. 32-35.

González L, Patterson I, Reid R, Foster G, Barberán M, Blasco J, Kennedy S, Howie F, Godfroid J, MacMillan A, et al. 2002. Chronic meningoencephalitis associated with *Brucella* sp. infection in live-stranded striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*). J Comp Pathol. 126:147–152.

Grabherr S, Grimm J, Dominguez A, Vanhaebost J, Mangin P. 2014. Advances in post-mortem CT-angiography. The British Journal of Radiology. 87(1036):1-9.

Groussaud P, Shankster S, Koylass M, Whatmore A. 2007. Molecular typing divides marine mammal strains of *Brucella* into at least three groups with distinct host preferences. J Med Microbiol. 56: 1512–1518.

Gul H, Erdem H. 2017. Brucellosis (*Brucella* Species) In: Bennett J, Dolin R, Blaser M, editors. Mandell, Douglas and Bennett's Infectious Disease Essentials. Philadelphia (PA): Elsevier. 328-329 p.

Güven T, Ugurlu K, Ergonul O, Kocagul A, Eren S, Comoglu S, Baykam N, Dokuzoguz B. 2013. Neurobrucellosis: clinical and diagnostic features. Clin Infect Dis. 56: 1407-1412.

Guzmán-Verri C, González-Barrientos R, Hernández-Mora G, Alberto Morales J, Baquero-Calvo E, Chaves-Olarte E, Moreno E. 2012. *Brucella ceti* and brucellosis in cetaceans. Front Cell Infect Microbiol. 3(2): 1-22.

Gulland F, Dierauf L, Whitman K. 2018. CRC Handbook of Marine Mammal Medicine. 3rd ed. Boca Raton (FL): CRC Press. 1144 p.

Gyldensted C, Kosteljanetz M. 1976. Measurements of the normal ventricular system with computer tomography of the brain. A preliminary study on 44 adults. *Neuroradiology*. 10: 205-213.

Hall D, Steffens W, Lassiter L. 1998. Lafora Bodies Associated with Neurologic Signs in a Cat. *Veterinary Pathology*. 35(3): 218-220.

Hamir A. 2011. Pathology of neurologic disorders of raccoons (*Procyon lotor*). *Jour Vet Diagn Invest*. 23(5): 873-884.

Harriman D, Millar J, Stevenson A. 1955. Progressive familial myoclonic epilepsy in three families: Its clinical features and pathological basis: An appendix on the genetic aspects. *Brain*. 78(3): 325-349.

Heinemann A, Vogel H, Heller M, Tzikas A, Püschel K. 2015. Investigation of medical intervention with fatal outcome: the impact of post-mortem CT and CT angiography. *La Radiologia Medica*. 120(9): 835-845.

Hernández-Mora G, González-Barrientos R, Morales J, Chaves-Olarte E, Guzmán-Verri C, Barquero-Calvo E, De-Miguel M, Marín C, Blasco J, Moreno E. 2008. Neurobrucellosis in Stranded Dolphins, Costa Rica. *Emerging Infectious Diseases*. 14 (9): 1430-1433.

Hernández-Mora G, Manire C, González-Barrientos R, Barquero-Calvo E, Guzmán-Verri C, Staggs L, Thompson R, Chaves-Olarte E, Moreno E. 2009. Serological diagnosis of *Brucella* infections in odontocetes. *Clin. Vaccine Immunol*. 16: 906-915.

Hernández-Mora G, Palacios-Alfaro J, González-Barrientos R. 2012. Stranded cetaceans in Costa Rica: Microorganism and diseases with public health and conservation impact. International Whale Commission (IWC) Scientific Committee Documents. 7p.

Hernández-Mora G, Palacios-Alfaro J, González-Barrientos R. 2013. Wildlife reservoirs of brucellosis: *Brucella* in aquatic environments. Rev sci tech Off int Epiz. 32(1): 89-103.

Hernández-Mora G, Ruiz-Villalobos N, Bonilla-Montoya R, Romero-Zúñiga JJ, Jiménez-Arias J, González-Barrientos R, Barquero-Calvo E, Chacón-Días C, Rojas N, Chaves-Olarte E, et al. 2017a. Epidemiology of bovine brucellosis in Costa Rica: lessons learned from failures in the control of the disease. PLoS One. 12(8): 11-17.

Hernández-Mora G, Bonilla-Montoya R, Barrantes-Granados O, Esquivel-Suárez A, Montero-Caballero D, González-Barrientos R, Fallas-Monge Z, Palacios-Alfaro J, Baldi M, Campos E, et al. 2017b. Brucellosis in mammals of Costa Rica: An epidemiological survey. PLoS One. 12(8): 1-10.

Hernández-Mora G, González-Barrientos R, Víquez-Ruíz E, Palacios-Alfaro J, Bettoni-Rodríguez G, Gendre M, Vincent C, Roca-Monge K, Ruiz-Villalobos N, Suárez-Esquivel M, Cordero-Chavarría M, Chaves-Olarte E, Thomson N, Barquero-Calvo E, Moreno E, Guzmán-Verri C. 2021. *Brucella* sp. sequence-type 27 associated with abortion in dwarf sperm whale *Kogia sima*. European Journal of Wildlife Research. 67 (4): 63.

Honnold S, Schulman F, Bauman K, Nelson K. 2010. Lafora's-like disease in a fennec fox (*Vulpes zerda*). J Zoo Wildl Med. 41(3): 530-534.

INPH Guideline Study Group. 2005. Guidelines for the diagnosis and management of idiopathic normal-pressure hydrocephalus. Neurosurgery. 57(3):2-52.

Ishii K, Kanda T, Harada A, Miyamoto N, Kawaguchi T, Shimada K, Ohkawa S, Uemura T, Yoshikawa T, Mori E. 2008. Clinical impact of the callosal angle in the diagnosis of idiopathic normal pressure hydrocephalus. *Eur Radiol.* 18:2678-2683.

Ishikawa M. 2004. Guideline Committee for Idiopathic Normal Pressure Hydrocephalus, Japanese Society of Normal Pressure Hydrocephalus. Clinical guidelines for idiopathic normal pressure hydrocephalus. *Neurol Med Chir (Tokyo).* 44:222-223.

Jacques I, Neubauer H, Walravens K, et al. 2009. MLVA-16 typing of 295 marine mammal *Brucella* isolates from different animal and geographic origins identifies 7 major groups within *Brucella ceti* and *Brucella pinnipedialis*. *BMC Microbiol.* 9:1,145.

Jauniaux T, Brenez C, Fretin D, Godfroid J, Haelters J, Jacques T, Kerckhof F, Mast J, Sarlet M, Coignoul F. 2010. *Brucella ceti* infection in harbor porpoise (*Phocoena phocoena*). *Emerg Infect Dis.* 16:1966–1968.

Jefferson T, Webber M, Pitman R. 2015. Marine Mammals of the world: A comprehensive Guide to Their Identification. 2nd ed. London (LON): Academic Press 30-278 p.

Kennedy S, Smyth J, Cush P, McAliskey M, McCullough S, Rima B. 1991. Histopathologic and immunocytochemical studies of distemper in harbor porpoises. *Vet Pathol.* 28(1): 1–7.

Kiefer M, Eymann R, Steudel W, Strowitzki M. 2005. Gravitational shunt management of long-standing overt ventriculomegaly in adult (LOVA) hydrocephalus. *J Clin Neurosci.* 12: 21-26.

Krishnan C, Kaplin A, Graber J, Darman J, Kerr D. 2005. Recurrent transverse myelitis following neurobrucellosis: immunologic features and beneficial response to

immunosuppression. *J Neurovirol.* 11(2): 225-231.

Kot B, Tsui H, Chung T, Lau Amy P. 2020. Postmortem neuroimaging of cetacean brains using computed tomography and magnetic resonance imaging. *Front. Mar. Sci.* 7: 544037.

Lafora G, Glueck B. 1911. Contribution to the histopathology of the myoclonic epilepsies. *Bull Gov Hosp Insa.* 6: 1-14.

Laubner S, Ondreka N, Failing K, Kramer M, Schmidt M. 2015. Magnetic resonance imaging signs of high intraventricular pressure-comparison of findings in dogs with clinically relevant internal hydrocephalus and asymptomatic dogs with ventriculomegaly. *BMC veterinary research.* 11: 181.

López-Goñi I, García-Yoldi D, Marin C, Miguel M, Muñoz P, Blasco J, Jacques I, Grayon M, Cloeckert A, Cardoso R, Sá M, Walravens K, Albert D, Garin-Bastuji B. 2008. Evaluation of a Multiplex PCR Assay (Bruce-ladder) for Molecular Typing of All *Brucella* Species, Including the Vaccine Strains. *Journal of clinical microbiology.* 46.

Lubani M, Dudin K, Araj G, Manandhar D, Rashid F. 1989. Neurobrucellosis in children. *Pediatr Infect Dis J.* 8: 79-82.

Mackie J, Blyde D, Harris L, Roe W, Keyburn A. 2020. Brucellosis associated with stillbirth in a bottlenose dolphin in Australia. *Australian Veterinary Journal.* 98 (3): 92-95.

Manire C, Rhinehart H, Barros N, Byrd L, Cunningham-Smith P. 2004. An approach to the rehabilitation of *Kogia* spp. *Aquat Mamm J.* 30: 257-270.

Maquart M, Le Flèche P, Foster G, Tryland M, Ramisse F, Djønné B, Al Dahouk S,

Obiako O, Ogoina D, Danbauchi S, Kwaifa S, Chom N, Nwokorie E. 2010. Neurobrucellosis –a case report and review of literature. Niger. J. Clin. Pract. 13: 347-350.

May-Collado L, Amador-Caballero M, Casa J, Gamboa-Poveda M. 2017. Ecology and Conservation of Cetaceans of Costa Rica and Panama. In: Rossi-Santos M, Finkl C, editors. In advances in Marine Vertebrate Research in Latin America. Switzerland: Springer Press. p. 293-319.

McAllister J, ChovanP , Steiner C, Johnson M, Ayzman I, Wood A, Tkach J, Hahn J, Luciano M. 1998. Differential ventricular expansion in hydrocephalus. Eur J Pediatr Surg. 8: 39-42.

McDonald W, Jamaludin R, Mackereth G, Hansen M, Humphrey S, Short P, Taylor T, Swingler J, Dawson C, Whatmore A, et al. 2006. Characterization of a *Brucella* sp. strain as a marine-mammal type despite isolation from a patient with spinal osteomyelitis in New Zealand. J Clin Microbiol. 44(12): 4363–4370.

McKenna M, Cranford T, Pyenson N. 2011. Morphology of the odontocete melon and its implications for acoustic function. Mar Mammal Science. 28: 690–713.

McLean D, Russell N, Khan M. 1992. Neurobrucellosis: clinical and therapeutic features. Clin. Infect. Dis. 15: 582-590.

Miller W, Adams L, Ficht T, Cheville N, Payeur J, Harley D, House C, Ridgway S. 1999. *Brucella*-induced abortions and infection in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). J Zoo Wildl Med. 30(1): 100–110.

Moore S. 2008. Marine mammals as ecosystem sentinels. J Mammal. 89(3): 534-540.

Moore M, der Hoop J, Barco S, Costidis A, Gulland F, Jepson P, Moore K, Raverty S, McLellan W. 2013. Criteria and case definitions for serious injury and death of pinnipeds and cetaceans caused by anthropogenic trauma. *Dis Aquat Organ*. 103(3): 229-264.

Muñoz P, De Miguel M, Marín C, Barberán M, Blasco J. 2006. Short Communications Isolation of *Brucella* species from a live-stranded striped dolphin (*Stenella coeruleoalba*) in Spain. *Vet Rec*. 158:450-451.

Nymo I, Tryland M, Godfroid J. 2011. A review of *Brucella* infection in marine mammals, with special emphasis on *Brucella pinnipedialis* in the hooded seal (*Cystophora cristata*). *Veterinary Research*. 42 (1): 93.

Nowak R. 1991. Walker's Mammals of the World. 5ed. Baltimore: Johns Hopkins University. Vol. 2. 1362 p.

OIE. 2009. Manual of diagnostic test and vaccines for terrestrial animals. In: Bovine Brucellosis. Office International des epizootics. Paris.

Palacios D, Gerrodette T. 1996. Potential impact of artisanal gillnet fisheries on small cetacean populations in the Eastern Tropical Pacific. . La Jolla (CA): Southwest Fisheries Science Center. Administrative Report LJ-96-11. 16 p.

Qasim S, Baharoon S, Layqah L. 2021. A Case of Seronegative Pediatric Neurobrucellosis Presenting With Ataxia. *Cureus*. 13(1):e12540.

Robles-Malagamba M, Hernández-Mora G, Granados-Zapata A, Kot B. 2021. Systematic analysis of the virtopsy findings of *Brucella ceti* infection in cetaceans using Post-mortem Computed Tomography. Unpublished manuscript.

Rodríguez-Fonseca J. 2001. Diversidad y distribución de los cetáceos de Costa Rica (Cetacea: Delphinidae, Physeteridae, Ziphiidae y Balaenopteridae). *Rev Biol Trop.* 49(2): 135-143.

Ross H, Foster G, Reid R, Jahans K, MacMillan A. 1994. *Brucella* species infection in sea-mammals. *Vet Rec.* 134: 359.

Seidel G, Pardo C, Newman-Toker D, Olivi A, Eberhart C. 2003. Neurobrucellosis presenting as leukoencephalopathy: the role of cytotoxic T lymphocytes. *Arch Pathol Lab Med.* 127(9): 374-377.

Shakir R, Al-Din A, Araj G, Lulu A, Mousa A, Saadah M. 1987. Clinical categories of neurobrucellosis: a report on 19 cases. *Brain.* 110: 213-23

Sierra E, Sánchez S, Saliki J, Blas-Machado U, Arbelo M, Zucca D, Fernández A. 2014. Retrospective study of etiologic agents associated with nonsuppurative meningoencephalitis in stranded cetaceans in the Canary Islands. *J Clin Microbiol.* 52(7): 2390-2397.

Sierra E, Fernández A, Felipe-Jiménez I, Zucca D, Di Francesco G, Díaz-Delgado J, Sacchini S, Rivero M, Arbelo M. 2019. Neurobrucellosis in a common bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) stranded in the Canary Islands. *BMC Vet Res.* 15: 353).

Sierra E, Fernández A, Felipe-Jiménez I, Zucca D, Díaz-Delgado J, Puig-Lozano R, Cámara N, Consoli F, Díaz-Santana P, Suárez-Santana C, Arbelo M. 2020. Histopathological Differential Diagnosis of Meningoencephalitis in Cetaceans: Morbillivirus, Herpesvirus, *Toxoplasma gondii*, *Brucella* sp., and *Nasitrema* sp. *Front Vet Sci.* 30 (7): 650.

[SINAC] Sistema Nacional de Áreas de Conservación (Costa Rica). 2016. Protocolo PRONAMEC: Protocolo para el monitoreo ecológico de las agregaciones de mamíferos acuáticos. San José (SJ): Programa de Naciones Unidas para el Desarrollo (PNUD) y El Fondo para el Medio Ambiente Mundial (GEF) . 5-10 p.

Skullerud K. 1985. Variations in the size of the human brain. Influence of age, sex, body length, body mass index, alcoholism, Alzheimer changes, and cerebral atherosclerosis. *Acta Neurol Scand Suppl.* 102: 1-94.

Sohn A, Probert W, Glaser C, Gupta N, Bollen A, Wong J, Grace E, Mc Donald W. 2003. Human neurobrucellosis with intracerebral granuloma caused by a marine mammal *Brucella* spp. *Emerging Infect. Dis.* 9: 485-488.

Stephens N, Duignan P, Wang J, Bingham J, Finn H, Bejder L, Patterson A, Holyoake C. 2014. Cetacean Morbillivirus in coastal Indo-Pacific Bottlenose Dolphins, Western Australia. *Emerg Infect Dis.* 20: 666–670.

Suárez-Esquivel M, Barker K, Ruiz-Villalobos N. 2017. *Brucella* Genetic Variability in Wildlife Marine Mammals Populations Relates to Host Preference and Ocean Distribution. *Genime Biol Evol.* 9(7): 1901-1912.

Suárez-Esquivel M, Ruiz-Villalobos N, Hernández-Mora G, González-Barrientos R, Palacios-Alfaro J, Barquero-Calvo E, Chaves-Olarte E, Thomson N, Moreno E, Guzmán Verri C. 2019. *Brucella* Sequence Type 27 Isolated from Dwarf Sperm Whale (*Kogia sima*) stranded in the Costa Rican Pacific Coast. *Access Microbioly.* 1: 911.

Swain L, Key G, Tauro A, Ahonen S, Wang P, Ackerley C, Minassian B, Rusbridge C. 2017. Lafora disease in miniature Wirehaired Dachshunds. *PLoS One.* 12(8): e0182024.

Tanabe S, Iwata H, Tatsukawa R. 1994. Global contamination by persistent organochlorines and their ecotoxicological impact on marine mammals. *Sci Total Environ.* 154: 163-177.

Toma A, Holl E, Kitchen N, Watkins L. 2011. Evans' index revisited: The need for an alternative in normal pressure hydrocephalus. *Neurosurgery.* 68: 939-944.

Ueno Y, Kumagai M, Kanamori H, Yanagisawa M, Kino S, Shigeno S, Ohishi K. 2020. Draft Genome Sequence of *Brucella ceti* Isolated in the Western Pacific Ocean. *Microbiology Resource Announcements.* 9 (39): e00925-20.

Van Bresse M, Raga J, Di Guardo G, Jepson P, Duignan P, Siebert U, Barrett T, Santos M, Moreno I, Siciliano S, et al. 2009. Emerging infectious diseases in cetaceans worldwide and the possible role of environmental stressors. *Dis. aquat. Organisms.* 86 (2), 143–157.

Van Horn J, McManus I. 1992. Ventricular enlargement in schizophrenia. A meta-analysis of studies of the ventricle:brain ratio (VBR). *Br J Psychiatry.* 160:687-697.

Virhammar J, Laurell K, Cesarini K, Larsson E. 2018. Increase in callosal angle and decrease in ventricular volume after shunt surgery in patients with idiopathic normal pressure hydrocephalus. *Journal of Neurosurgery JNS.* 130(1): 130-135

Ward N, Bogomolni A, Potter C. 2013. A Stranding Guide to Marine Mammals of the Wider Caribbean Region: An introductory field guide for stranding responders. Woods Hole (MA): Gecko Productions Inc. 7 p.

Wehrtmann S, Cortés J. 2009. Diversity of Marine Habitats of the Caribbean and Pacific of Costa Rica. In: Wehrmann S, Cortés J, editors. Marine Biodiversity of Costa Rica, Central America. Netherlands: Springer. p. 2-4.

West K, Levine G, Jacob J, Jensen B, Sanchez S, Colegrove K, Rotstein D. 2015. Coinfection and vertical transmission of *Brucella* and Morbillivirus in a neonatal sperm whale (*Physeter macrocephalus*) in Hawaii, USA. J. Wildl. Dis. 51:227-232.

Whatmore A, Dawson C, Groussaud P, Koylass M, King A, Shankster S, Sohn A, Probert W, McDonald W. 2008. Marine Mammal *Brucella* genotype associated with zoonotic infection. Emerg Infect Dis. 14(3): 517-8.

Wohlsein P, Deschl U, Baumgartner W. 2012. Nonlesions, Unusual Cell Types, and Postmortem Artifacts in the Central Nervous System of Domestic Animals. Vet Pathol. 50(1): 122-143.

Wu Q, McFee WE, Goldstein T, Tiller RV, Schwacke L. 2014. Real-time PCR assays for detection of *Brucella* spp. and the identification of genotype ST27 in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). J Microbiol Methods. 100: 99-104.

Xiang L, Zhou G, Su P, Xia S, Han B, Wang Y, Zhang T. 2013. Could postmortem hemorrhage occur in the brain?: a preliminary study on the establishment and investigation of postmortem hypostatic hemorrhage using rabbit models. Am J Forensic Med Pathol. 34 (2):147-149.

Yuen A, Tsui H, Kot B. 2017. Accuracy and reliability of cetacean cranial measurements using computed tomography three dimensional volume rendered images. PLoS One. 12: e0174215.

Zhang T, Zhou Y, Su G, Shi D, Gopinath S, Lakshmi Priya T, Li S. 2019. Hydrocephaly analysis supported by computerized tomography and nuclear magnetic resonance. *Journal of analytical methods in chemistry*. 19: 5872347.

Zheng R, Xie S, Lu X, Sun L, Zhou Y, Zhang Y, Wang K. 2018. A Systematic Review and Meta-Analysis of Epidemiology and Clinical Manifestations of Human Brucellosis in China. *BioMed research international*. 5712920.